



UNIVERZITET U NOVOM SADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

AGRONOMIJA

Dragana Radunović, master inženjer

**Rasprostranjenost, domaćini i karakterizacija populacije
Erwinia amylovora u Crnoj Gori**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Novi Sad, 2018.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

MENTOR

**dr Vera Stojšin, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet**

MENTOR

**dr Veljko Gavrilović, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd**

ČLAN KOMISIJE

**dr Mila Grahovac, docent
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet**

ČLAN KOMISIJE

**dr Ferenc Bagi, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet**

ČLAN KOMISIJE

**dr Jelena Zindović, viši naučni saradnik
Univerzitet Crne Gore, Biotehnički fakultet, Podgorica**

DATUM ODBRANE

Univerzitet u Novom Sadu
Poljoprivredni fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dragana Radunović, master inž.
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Vera Stojšin, redovni profesor dr Veljko Gavrilović, viši naučni saradnik
Naslov rada: NR	Rasprostranjenost, domaćini i karakterizacija populacije <i>Erwinia amylovora</i> u Crnoj Gori
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	Srpski i engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	(9 poglavlja / 121 strana / 93 slike/ 15 tabela/ 3 grafikona /2 grafika/123 reference / 1 prilog/zahvalnica/biografija)
Naučna oblast: NO	Poljoprivredne nauke – Agronomija
Naučna disciplina: ND	Fitomedicina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Erwinia amylovora</i> , Crna Gora, rasprostranjenost, domaćini, populacija, bakteriološke odlike, serološke odlike, Nested PCR, rep–PCR, RAPD PCR diverzitet
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad
Važna napomena: VN	Istraživanja u ovoj disertaciji obavljena su u okviru naučno–istraživačkog projekta Ministarstva nauke Crne Gore
Izvod: IZ	<p><i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow, uzročnik je bakteriozne plamenjače, jedne od najdestruktivnijih bolesti voćaka i ukrasnih biljaka i jedne od najštetnijih bakterijskih bolesti gajenih biljaka. U Crnoj Gori prisustvo ove bakterije prvi put je uočeno 1993. godine, na stablima kruške, u opštinama Berane i Andrijevice, u severnom delu zemlje, a eksperimentalno potvrđeno 2003. godine u uzorcima jabuke iz okoline Nikšića.</p> <p>U okviru ovog istraživanja izvršena su proučavanja bakterije <i>E. amylovora</i> u Crnoj Gori. Istraživanje je obuhvatilo terenski i laboratorijski rad, u periodu 2012–2015. godine. Na terenu je posmatrana pojava simptoma bakteriozne plamenjače na osetljivim vrstama, utvrđen krug domaćina i rasprostranjenost bakterije po opštinama. Prilikom terenskih obilazaka sakupljeno je preko 200 biljnih uzoraka sa simptomima bolesti, iz kojih je uspešno izolovana bakterija. Potvrđeno je da je ova bakterija široko rasprostranjena na čitavoj teritoriji države, posebno u voćarskim regionima u severoistočnim i zapadnim, kontinentalnim delovima zemlje. Prisustvo <i>E. amylovora</i> utvrđeno je na pet domaćina, među kojima su četiri voćne vrste: dunja (<i>Cydonia oblonga</i>), kruška (<i>Pyrus communis</i>), jabuka (<i>Malus domestica</i>) i mušmula (<i>Mespilus germanica</i>), kao i jedna vrsta iz</p>

	<p>spontane flore— glog (<i>Crataegus</i> sp.).</p> <p>Praćenjem uticaja meteoroloških faktora na pojavu simptoma bakteriozne plamenjače u klimatski različitim regionima Crne Gore, uočena je njihova tesna korelacija. Utvrđeno je da zasadi dunje, kruške i jabuke, kao i pojedinačna jako zaražena stabla ovih voćnih vrsta u severoistočnim (lokaliteti Bijelo Polje i Berane) i zapadnim (lokalitet Nikšić) delovima zemlje predstavljaju žarišta iz kojih se bakterija širi na nova područja i nove biljke domaćine. Navedeni podaci ukazuju na činjenicu da je poslednjih godina došlo do širenja <i>E. amylovora</i> u kontinentalnom delu zemlje, gde je prouzrokovala značajnije štete. Zbog toga ova bakterija danas predstavlja ozbiljnu pretnju uspešnom gajenju jabučastih voćaka u Crnoj Gori, posebno imajući u vidu da se površine pod ovim voćnim vrstama iz godine u godinu povećavaju.</p> <p>U laboratorijskim istraživanjima, iz prikupljenih biljnih uzoraka dobijeno je 60 bakterijskih izolata poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta. Proučavani izolati ispoljili su izrazitu uniformnost u pogledu patogenih, odgajivačkih, morfoloških i biohemijsko–fizioloških odlika i utvrđeno je da pripadaju vrsti <i>E. amylovora</i>. Serološke analize (ELISA i IF test) obuhvatile su 27 odabranih sojeva <i>E. amylovora</i> poreklom iz dunje, kruške, jabuke i gloga, sa različitih lokaliteta u Crnoj Gori, kod kojih je potvrđena homogenost u antigenoj strukturi.</p> <p>Ovim istraživanjem su prvi put u Crnoj Gori primenjene molekularne metode u proučavanju <i>E. amylovora</i>. Primenjeno je nekoliko molekularnih tehnika: Nested PCR (korišćenjem dva para prajmera AJ75/AJ76, PEANT1/PEANT2), rep-PCR (korišćenjem REP, ERIC i BOX prajmera) i RAPD PCR (korišćenjem dva random prajmera CUGEA3 i CUGEA5). Molekularne analize omogućile su identifikaciju i proučavanje genetske strukture 18 sojeva <i>E. amylovora</i>, poreklom iz dunje, kruške, jabuke i gloga, sa različitih lokaliteta. Dobijeni rezultati ukazali su na genetsku različitost proučavanih sojeva iz kruške u odnosu na sojeve iz drugih biljaka domaćina, bez obzira na lokalitet iz kojeg su izolovani. Ovo su prva istraživanja genetske varijabilnosti <i>E. amylovora</i> u Crnoj Gori.</p>
--	--

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	6. oktobar 2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>dr Vera Stojšin, redovni profesor za užu naučnu oblast Fitopatologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet – mentor</p> <p>dr Veljko Gavrilović, viši naučni saradnik za užu naučnu oblast Fitopatologija, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd – mentor</p> <p>dr Mila Grahovac, docent za užu naučnu oblast Fitopatologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet – član</p> <p>dr Ferenc Bagi, redovni profesor za užu naučnu oblast Fitopatologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet – član</p> <p>dr Jelena Zindović, viši naučni saradnik za užu naučnu oblast Fitopatologija, Univerzitet Crne Gore, Biotehnički fakultet, Podgorica – član</p>

University of Novi Sad
Faculty of Agriculture
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Dragana Radunovic, MSc
Mentor: MN	Vera Stojšin, PhD, Full Professor Veljko Gavrilovic, PhD, Senior Research Fellow
Title: TI	Distribution, plant hosts and characterization of <i>Erwinia amylovora</i> population in Montenegro
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbin and English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Autor's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Department of Phytomedicine and Environmental Protection, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovica 8

Physical description: PD	(chapter 9/ 121 pages / 93 pictures / 15 tables/ 3 charts / 2 graphics /123 references / 1 contribution /acknowledgments /biography)
Scientific field SF	Agricultural sciences – Agronomy
Scientific discipline SD	Phytomedicine
Subject, Key words SKW	<i>Erwinia amylovora</i> , Montenegro, distribution, plant hosts, population, bacteriological characteristics, serological characteristics, Nested PCR, rep-PCR, RAPD PCR diversity
UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture in Novi Sad
Note: N	Investigations in this PhD thesis were supported by Ministry of Science in Montenegro, Research Project
Abstract: AB	<p><i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow is the causal agent of fireblight, one of the most destructive diseases of fruits and ornamental plants and one of the most damaging diseases of cultivated plants. In Montenegro, fireblight symptoms were observed for the first time in 1993 on pear trees in the municipalities of Berane and Andrijevica, in northern part of the country. The occurrence this bacterium was experimentally confirmed in 2003 on apple samples from vicinity of Nikšić.</p> <p>Studies of bacterium <i>E. amylovora</i> in Montenegro were carried out in this research. The study comprised of field and laboratory work, conducted in the period 2012–2015. During fieldwork, the fireblight symptoms were observed on susceptible species, host range and distribution of bacterium in the municipalities was determined. More than 200 plant samples with fireblight symptoms were collected, from which the bacterium was successfully isolated. Widespread of the bacterium was confirmed in whole country, particularly in fruit growing regions in northeastern and western continental part. Presence of <i>E. amylovora</i> was confirmed on five hosts, including four fruit species: quince (<i>Cydonia oblonga</i>), pear</p>

	<p>(<i>Pyrus communis</i>), apple (<i>Malus domestica</i>), medlar (<i>Mespilus germanica</i>) and one species from spontaneous flora – hawthorn (<i>Crataegus</i> sp.).</p> <p>Monitoring effects of meteorological factors on fireblight symptom occurrence in different climatic regions of Montenegro revealed their high correlation. Quince, pear and apple orchards, as well as single heavily infected trees in northeastern (localities Bijelo Polje and Berane) and western (locality Nikšić) parts of the country, have been confirmed as hotspots from which the bacterium spreads to other areas and new hosts. Presented data points to the fact that in the last few years <i>E. amylovora</i> spread in continental part of the country where it caused significant damages. Therefore, this bacterium presents is a serious threat to successful cultivation of pome fruits, especially because these areas are becoming larger each year in Montenegro.</p> <p>Collected samples plants from different hosts and localities yielded 60 bacterial isolates in laboratory studies. Studied isolates showed pronounced uniformity in pathogenic, cultural, morphological and biochemical–physiological characteristics and it is confirmed that they belong to the species <i>E. amylovora</i>. Serological analysis (ELISA and IF tests) confirmed homogeneity in antigenic structure within 27 selected strains of <i>E. amylovora</i> originating from quince, pear, apple and hawthorn from different localities in Montenegro.</p> <p>This research carried out the first molecular techniques in studying of <i>E. amylovora</i> in Montenegro. Several molecular techniques were applied: Nested PCR (using two primer pairs AJ75/AJ76, PEANT1/PEANT2), rep–PCR (using REP, ERIC and BOX primers) and RAPD PCR (using two primers CUGEA3 and CUGEA5). Molecular analyzes enabled identification and studying of genetic structure of 18 strains of <i>E. amylovora</i> originating from quince, pear, apple and hawthorn, from different localities. The results showed genetic diversion of studied strains from pear compared to all strains originating from other host plants, regardless locality. This is the first study of genetic variability of <i>E. amylovora</i> in Montenegro.</p>
--	--

Accepted on Scientific Board on: AS	October 6th 2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>Vera Stojšin PhD, Full Professor for scientific field of Phytopathology, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture – mentor</p> <p>Veljko Gavrilović PhD, Senior Researcher for the scientific field of Phytopathology, Institute for Pesticide and Environmental Protection, Belgrade – mentor</p> <p>Mila Grahovac PhD, Assistant Professor for the scientific field of Phytopathology, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture – member</p> <p>Ferenc Bagi PhD, Full Professor for the scientific field of Phytopathology, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture – member</p> <p>Jelena Zindović PhD, Senior Researcher for the scientific field of Phytopathology, University of Montenegro, Biotechnical faculty – member</p>

Zahvalnica

Doktorska disertacija urađena je u okviru Nacionalnog naučno–istraživačkog projekta Ministarstva nauke i Ministarstva poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore, pod nazivom „Serološka i molekularna karakterizacija sojeva Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al. dobijenih sa različitih biljnih vrsta u Crnoj Gori“. Na ovom projektu sam bila angažovana kao saradnica u istraživanju, u periodu 2012–2015. godine.

Tokom rada bilo je lepih, ali i teških, naizgled nesavladivih momenata, kroz koje su me uspešno vodili moji mentori. Zbog toga se, pre svega, zahvaljujem njima: profesorici dr Jelici Balaž, na prenetom znanju i savetima na samom početku istraživanja i profesorici dr Veri Stojšin, na podršci i korisnim sugestijama u nastavku rada na disertaciji. Posebnu i najveću zahvalnost dugujem mentoru dr Veljku Gavriloviću, koji je kao rukovodilac projekta definisao program istraživanja i doktorske disertacije i koji je sve vreme bio uz mene, na terenu i u laboratoriji, prenosio mi svoje znanje i davao podstrek za rad.

Zahvaljujem se članovima komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije dr Ferencu Bagiju i dr Mili Grahovac, na korisnim sugestijama u pisanju ovog rada.

Mnogo je ljudi koji su mi pomogli u različitim fazama rada na doktorskoj disertaciji. Pre svih, to su moje kolegice i kolege iz Savjetodavne službe, ovim putem se zahvaljujem njima, a posebno mr Ivoni Jočić i mr Nebojši Veličkoviću, na pomoći i učešću u terenskom radu. Zahvalnost dugujem i profesoricama sa Biotehničkog fakulteta u Podgorici, dr Jeleni Zindović na korisnim savetima tokom istraživanja i podršci da istrajem u radu, kao i dr Mirjani Bojanić-Rašović na ustupljenoj laboratoriji. Zahvaljujem se kolegama sa Departmana za fitomedicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, posebno dr Renati Ilić i Saši Bančeviću, na pomoći i kolegijalnosti. U eksperimentalnom radu veliku pomoć sam imala od dr Katarine Gašić iz Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu i njoj se ovom prilikom zahvaljujem.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, suprugu, deci, bratu i roditeljima, koji su mi pružili ogromnu podršku u radu. Zbog toga je i ova disertacija deo njihove upornosti i životnih usmeravanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	14
2. PREGLED LITERATURE	16
2.1. Klimatski uslovi u Crnoj Gori	16
2.2. Rejonizacija poljoprivrede	16
2.3. Obim i struktura poljoprivredne proizvodnje	19
2.4. Voćarstvo u Crnoj Gori	20
2.5. Rasprostranjenost i značaj <i>E. amylovora</i>	22
2.6. Domaćini	23
2.7. Simptomi bolesti	25
2.8. Epidemiološko–ekološke karakteristike <i>E. amylovora</i>	26
2.9. Uticaj meteoroloških faktora na pojavu bolesti	28
2.10. Patogene odlike <i>E. amylovora</i>	29
2.11. Morfološke odlike <i>E. amylovora</i>	30
2.12. Odgajivačke odlike <i>E. amylovora</i>	31
2.13. Biohemijsko–fiziološke odlike <i>E. amylovora</i>	31
2.14. Serološke odlike <i>E. amylovora</i>	32
2.15. Molekularne odlike <i>E. amylovora</i>	33
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
4. MATERIJAL I METODE	36
4.1. Lokaliteti ispitivanja pojave i rasprostranjenosti bakterije.....	36
4.2. Domaćini bakterije, ocena štetnosti i simptomi	36
4.3. Praćenje uticaja meteoroloških faktora na pojavu bolesti	37
4.4. Izolacija bakterije	39
4.5. Test patogenosti	43
4.5.1. Inokulacija plodova kruške i šljive	43
4.5.2. Hipersenzitivna reakcija	43
4.6. Morfološke odlike proučavanih izolata	43
4.7. Odgajivačke odlike proučavanih izolata	44
4.8. Biohemijsko–fiziološke odlike proučavanih izolata	44
4.8.1. Aktivnost oksidaze	45

4.8.2.	Aktivnost katalaze	45
4.8.3.	Oksidativno–fermentativni metabolizam glukoze	45
4.8.4.	Stvaranje levana	45
4.8.5.	Hidroliza skroba	46
4.8.6.	Hidroliza eskulina	46
4.8.7.	Hidroliza želatina	46
4.8.8.	Hidroliza Tween–a 80 (estra oleinske kiseline)	46
4.8.9.	Stvaranje amonijaka	47
4.8.10.	Redukcija nitrata	47
4.8.11.	Osetljivost na streptomycin i hloramfenikol	47
4.9.	Serološke odlike proučavanih sojeva	47
4.9.1.	ELISA test	48
4.9.2.	IF test	50
4.10.	Molekularne odlike proučavanih sojeva	51
4.10.1.	Izolacija DNK bakterije	52
4.10.2.	Nested PCR	52
4.10.3.	Rep–PCR	53
4.10.4.	RAPD PCR	54
5.	REZULTATI	55
5.1.	Pojava i rasprostranjenost bakterije na istraživanim lokalitetima	55
5.2.	Domaćini bakterije, ocena štetnosti i simptomi	68
5.3.	Praćenje uticaja meteoroloških faktora na pojavu bolesti	5
5.4.	Izolacija bakterije	80
5.5.	Test patogenosti	80
5.5.1.	Inokulacija plodova kruške i šljive	80
5.5.2.	Hipersenzitivna reakcija	80
5.6.	Morfološke odlike proučavanih izolata	83
5.7.	Odgajivačke odlike proučavanih izolata	83
5.8.	Biohemijsko–fiziološke odlike proučavanih izolata	84
5.9.	Serološke odlike proučavanih sojeva	87
5.9.1.	ELISA test	87
5.9.2.	IF test	88
5.10.	Molekularne odlike proučavanih sojeva	89
5.10.1.	Nested PCR	89
5.10.2.	Rep–PCR	90
5.10.3.	RAPD PCR	92

6. DISKUSIJA	94
7. ZAKLJUČAK	104
8. LITERATURA	106
9. PRILOG	117
BIOGRAFIJA	121

1. UVOD

Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka koju prouzrokuje *Erwinia amylovora*, jedna je od najdestruktivnijih bakterijskih bolesti na jabučastom voću (Bonn and van der Zwet, 2000; Norelli et al., 2003). Osim što umanjuje prinos i kvalitet plodova, ova bolest utiče na skraćenje životnog veka voćaka i često ih dovodi do potpunog propadanja (Panić i Arsenijević, 1996).

Gubici u svetu od bakteriozne plamenjače su ogromni. Od kada se pojavila do danas, nanela je ogromne štete u voćarskoj proizvodnji mnogih zemalja. U periodu 1901–1904. godine uništila je 98,8% zasada kruške u SAD-u (Arsenijević, 1997). U Francuskoj, u periodu 1979–1982. godine, gubici na krušci procenjeni su na 3.750.000 francuskih franaka, dok su u Nemačkoj gubici na jabuci i glogu u 1988. godini iznosili 60.000 nemačkih maraka (Garrett, 1990, prema: Arsenijević, 1997). Tokom 90-tih godina prošlog veka, u severozapadnom delu SAD-a štete su procenjene na 68 miliona američkih dolara, a na Novom Zelandu 10 miliona dolara. Nekoliko epidemijskih pojava bakteriozne plamenjače na jabuci, u američkoj državi Mičigen, tokom 2000. godine, dovelo je do propadanja više od 220 000 stabala, na više od 240 ha, sa gubicima koji su procenjeni na 42 miliona dolara (Norelli et al., 2003; Janse, 2006).

Na teritoriji bivše Jugoslavije, do kraja 1990. godine iskrčeno je oko 224 ha kruške i 48 ha dunje. Na osnovu literaturnih podataka gubici prouzrokovani bakterioznom plamenjačom na teritoriji bivše Jugoslavije su procenjeni na oko 12.000.000 DM (Balaž et al., 2013). U Srbiji, zbog velikih površina na kojima se gaje jabučaste voćne vrste, bakteriozna plamenjača je prouzrokovala velike ekonomske štete (Panić i Arsenijević, 1996; Balaž i sar., 1997; Gavrilović i Arsenijević, 1998; Jovanović, 1999; Balaž, 1999, 2000; Gavrilović i sar., 2001; Obradović i sar., 2003; Arsenijević i Gavrilović, 2007).

Malo je literaturnih podataka o *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. u Crnoj Gori za proteklih 20-ak godina. Prema Paniću i Arsenijeviću (1996) simptomi bakteriozne plamenjače prvi put su zapaženi 1993. godine na krušci u severnom delu zemlje, u opštinama Berane (raniji naziv Ivangrad) i Andrijevice. Arsenijević i Gavrilović (2007) navode da je prisustvo ove bakterije eksperimentalno dokazano 2003. godine na jabuci u okolini Nikšića. Obradović i sar. (2003) zabeležili su epifitotičnu pojavu bakteriozne plamenjače na dunji, na teritoriji više opština u kontinentalnim delovima zemlje (Bijelo Polje, Berane, Mojkovac i Nikšić).

Istraživanja u okviru rada na doktorskoj disertaciji sprovedena su u periodu 2012–2015. godine i obuhvatila su terenska ispitivanja i laboratorijski rad. Terenska istraživanja obavljena su u cilju utvrđivanja statusa (rasprostranjenosti, kruga domaćina, štetnosti i epidemiologije) fitopatogene bakterije *E. amylovora* u Crnoj Gori. Zdravstveni pregledi u cilju otkrivanja

simptoma bakteriozne plamenjače obuhvatili su jabučaste voćne vrste, ukrasne biljke i biljke iz spontane flore, na kojima se ova bakterija održava. Monitoring je prvenstveno obuhvatio najznačajnije voćarske regione (u severnom i zapadnom delu zemlje), a zatim i čitavu teritoriju države.

Proučavanje epidemiologije bakterije, kao i nastanka povoljnih uslova za infekciju, vršeno je uz pomoć automatskih meteoroloških stanica iMETOS (Pessl Instruments), koje su omogućile prikupljanje meteoroloških podataka. Istovremeno su posmatrane i fenofaze u razvoju dunje, jabuke i kruške, na odabranim lokalitetima, što je zajedno sa dobijenim meteorološkim podacima poslužilo za utvrđivanje povoljnih uslova za ostvarivanje infekcije. Poseban akcenat bio je na praćenju zaraza u fazi cvetanja ovih voćnih vrsta, kao presudnih za pojavu i širenje bolesti.

Laboratorijski rad obuhvatio je izolaciju bakterije iz prikupljenih biljnih uzoraka i ispitivanje bakterioloških karakteristika odabranih izolata, u cilju njihove determinacije. Prikupljeno je preko 200 uzoraka različitih biljnih vrsta poreklom sa različitih lokaliteta. Nakon uspešne izolacije bakterije na hranljive podloge, odabrano je 60 izolata za dalja istraživanja. U identifikaciji bakterije primenjeno je više različitih testova kombinacijom klasičnih bakterioloških, seroloških i molekularnih metoda. U okviru klasičnih bakterioloških metoda, proučene su patogene, odgajivačke i biohemijsko–fiziološke karakteristike odabranih izolata (van der Zwet and Keil, 1979; Schaad et al., 2001; Jones and Geider, 2001). Za serološke analize odabrano je 27 sojeva *E. amylovora*, poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta, izolovanih u periodu 2012–2014. godine. U proučavanju antigenih osobina sojeva primenjeni su ELISA i IF test (OEPP/EPPO, 2013).

Molekularne analize obavljene su u cilju identifikacije i proučavanja genetskog diverziteta bakterije. Za molekularne analize odabrano je 18 sojeva *E. amylovora* poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta, izolovanih u periodu 2012–2015. godine. Primenjena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR). U radu su korišćeni specifični oligonukleotidi (prajmeri) koji su omogućili umnožavanje ciljane sekvence DNK bakterije i *in vitro* sintezu kopija željenog fragmenta. Primenjeno je nekoliko PCR metoda: Nested PCR (Llop et al., 2000), rep–PCR (Versalovic et al., 1991, 1994; Schaad et al., 2001) i RAPD PCR (Momol et al., 1997). Primenjene molekularne metode pokazale su visoku specifičnost i osetljivost u identifikaciji i diferencijaciji proučavanih sojeva iz dunje, jabuke, kruške i gloga, sa različitih lokaliteta u zemlji. Ovo su prva istraživanja genetske varijabilnosti *E. amylovora* u Crnoj Gori koja su sprovedena primenom molekularnih tehnika.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Klimatski uslovi u Crnoj Gori

Klima u Crnoj Gori, na relativno malom prostoru, oštro se smenjuje od mediteranske (u južnom delu) do umereno kontinentalne (centralni deo) i planinske (severni deo). Na klimatske promene jak uticaj imaju blizina mora i reljef kojeg karakterišu planinski venci sa kotlinama, visoravnima i rečnim dolinama.

Sa aspekta značaja i uticaja klime na poljoprivrednu proizvodnju, u okviru teritorije Crne Gore može se izdvojiti više klimatskih zona, koje uslovljavaju različite mogućnosti za bavljenje poljoprivrednom proizvodnjom. Prva klimatska zona obuhvata pojas primorja i Zetsko–bjelopavličke ravnice, sa okolnim brdovitim terenima do 600 m nadmorske visine i karakteriše je mediteranska i izmenjena mediteranska klima. Srednja godišnja temperatura u ovoj klimatskoj zoni je 14–15 °C, sa godišnjom količinom padavina od 1300–2500 mm. Usled neravnomernog rasporeda padavina u toku godine, ova zona se karakteriše izraženom aridnošću, odnosno, dužim sušnim periodima.

Druga klimatska zona obuhvata kontinentalni deo Crne Gore, do 1000 m nadmorske visine, kao i doline reka Ibar, Lim, Tara, Čehotina i Piva. Ovu zonu karakteriše kontinentalna klima, sa prosečnim temperaturama od 8–9 °C i ravnomerni raspored padavina, koje iznose svega 800–900 mm godišnje. Treću klimatsku zonu čine područja iznad 1000 m nadmorske visine, odnosno 1500 m nadmorske visine, u kojima vlada subplaninska i planinska klima.

U Crnoj Gori izražene su i vertikalne zonalne razlike. Idući od juga ka severu i iz rečnih dolina prema planinama, klima je sve oštija, pa je ograničen i izbor biljnih i životinjskih vrsta koje se mogu gajiti (Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja, 2015).

2.2. Rejonizacija poljoprivrede

Prirodni uslovi za razvoj poljoprivrede u Crnoj Gori su veoma raznovrsni i složeni. Izražena raznolikost klime i reljefa u značajnoj meri određuje uslove za bavljenje poljoprivrednom proizvodnjom. Na osnovu klimatskih uslova i strukture poljoprivredne proizvodnje, Crna Gora se uslovno može podeliti na pet rejona, sa pripadajućim opštinama (Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja, 2015) (**Grafikon 1**). Treba istaći da usled izraženih reljefnih razlika na malom prostoru, u okviru svakog od prikazanih rejona postoji

heterogenost u pogledu uslova za bavljenje poljoprivredom. Osim toga, ni razlike između reiona nisu precizno određene, pa ih je potrebno posmatrati uslovno.



Grafikon 1: Karta teritorijalnog rasporeda poljoprivrednih reiona u Crnoj Gori
(Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja 2015–2020, 2015)

Primorski rejon obuhvata opštine crnogorskog primorja, što čini 11,5% ukupne teritorije Crne Gore. Rejon raspolaže sa oko 20.000 ha obradivih površina relativno dobre plodnosti, koje čine duboka aluvijalno–deluvijalna zemljišta u poljima i uvalama i smeđa antropogena zemljišta na terasama i zaravnima. Ovaj rejon je posebno pogodan za voćarsku (južno voće i masline) i povrtarsku proizvodnju. Područje je bogato medonosnim, aromatičnim i lekovitim biljem, kao i divljim vrstama voća (šipak, smokva i dr.), što pruža mogućnosti za bavljenje pčelarstvom i sakupljanje biljaka. Brdoviti tereni pogodni su za gajenje stoke (sitnih preživara).

Zetsko–bjelopavlički rejon čine područja opština Podgorica i Danilovgrad, na koje otpada 14% ukupne teritorije. U ovom rejonu nalaze se glavni ravničarski kompleksi (Zeta,

Malesija, Bjelopavlička ravnica i Čemovsko polje), u kojima dominiraju smeđa zemljišta koja na području Zete i Malesije prelaze u zonu aluvijalnih i močvarnih. Ovo je i najznačajniji poljoprivredni rejon Crne Gore u kojem se uspešno može odvijati proizvodnja povrća, ratarskih i voćarsko–vinogradarskih kultura (uključujući smokvu, narandžu i kivi), kao i stočarska proizvodnja.

Rejon krša obuhvata područja opština Cetinje i Nikšić. Ovo područje ima veoma malo obradivog zemljišta, koje se uglavnom nalazi u kraškim poljima, vrtačama i uvalama koje su brojne, ali male i razbacane. Iako rejon krša čini 21% ukupne teritorije države, obradivih površina ima samo 8,3%, što zajedno sa izraženom bezvodnošću ovog rejona (izuzev Nikšićkog i Grahovskog polja) ograničava biljnu proizvodnju na ratarstvo i delom voćarstvo (do 700–800 m nadmorske visine). Najvažnija poljoprivredna grana je stočarstvo, posebno kozarstvo i ovčarstvo, a zatim govedarstvo i pčelarstvo.

Severno–planinski rejon je teritorijalno najveći (32,5%) i obuhvata opštine centralnog i severnog dela. Na ovom području nalaze se brojne visoravni i zaravnjeni platoi, često i sa dubljim zemljištima, pogodnim za gajenje strnih žita, krompira i kupusnjača. Najveće površine ovog rejona čine pašnjaci, pogodni za letnju ispašu stoke. Generalno, ovaj rejon se odlikuje kraćim vegetacionim periodom, dužim snežnim pokrivačem, oštrim zimama i čestim mrazovima tokom jeseni i proleća, što značajno ograničava izbor vrsta i bavljenje poljoprivredom.

Polimsko–ibarski rejon obuhvata područje u dolinama reka Lim i Ibar (20,5% teritorije). U ovom rejonu, proporcionalno veličini teritorije, nalazi se najveći procenat obradivih površina 32,9% (62.000 ha). Uglavnom su to plodna aluvijalna, deluvijalna i smeđa zemljišta na starim rečnim terasama i jezerskim sedimentima, na ravnom i blago valovitom terenu, kao i smeđe, uglavnom kiselo zemljište, na umereno strmim padinama rečnih dolina. Sve ovo, zajedno sa klimatskim uslovima i bogatstvom u izvorskim i tekućim vodama, koje se mogu koristiti i za navodnjavanje, čini ovaj rejon izuzetno značajnim i pruža mogućnost bavljenja svim granama poljoprivrede (ratarstvo sa povrtarstvom, voćarstvo i stočarstvo).

Glavni ograničavajući faktor u razvoju poljoprivrede Crne Gore je izrazito brdsko–planinsko područje sa oštrim reljefom i nedostatak ravnih površina u severnom i severozapadnom delu zemlje, kao i planinski venci koji odvajaju obalu od centralnog dela zemlje. Pored toga, sklop prirodnih uslova i nerešenih imovinskih odnosa vlasništva nad zemljom, doprineo je da se poljoprivredna proizvodnja zasniva i odvija uglavnom na malim porodičnim gazdinstvima, sa prosečnom veličinom gazdinstva manjom od 2 ha (Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja, 2015). Prikaz poljoprivrednih površina po rejonima dat je u **tabeli 1**.

Tabela 1. Struktura poljoprivrednih površina po rejonima.

Rejon	Opštine	Ukupna površina		Poljoprivredno zemljište		Obradivo zemljište	
		(km ²)	(%)	(ha)	(%)	(ha)	(%)
Primorski	Herceg Novi, Kotor, Tivat, Budva, Bar, Ulcinj	1.591	11,5	50.815	9,8	19.353	10,3
Zetsko–bjelopavlički	Podgorica, Danilovgrad	1.942	14,0	78.997	15,3	29.045	15,3
Rejon krša	Cetinje, Nikšić	2.975	21,5	74.320	14,3	15.867	8,3
Severno–planinski	Kolašin, Mojkovac, Pljevlja, Žabljak, Šavnik, Plužine	4.462	32,5	184.528	35,6	63.054	33,2
Polimsko–ibarski	Andrijevisa, Berane, Bijelo Polje, Plav, Rožaje	2.842	20,5	129.804	25,0	62.374	32,9
Crna Gora – ukupno		13.812	100,0	518.067	100,0	189.745	100,0

Izvor: Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja 2015–2020 (2015)

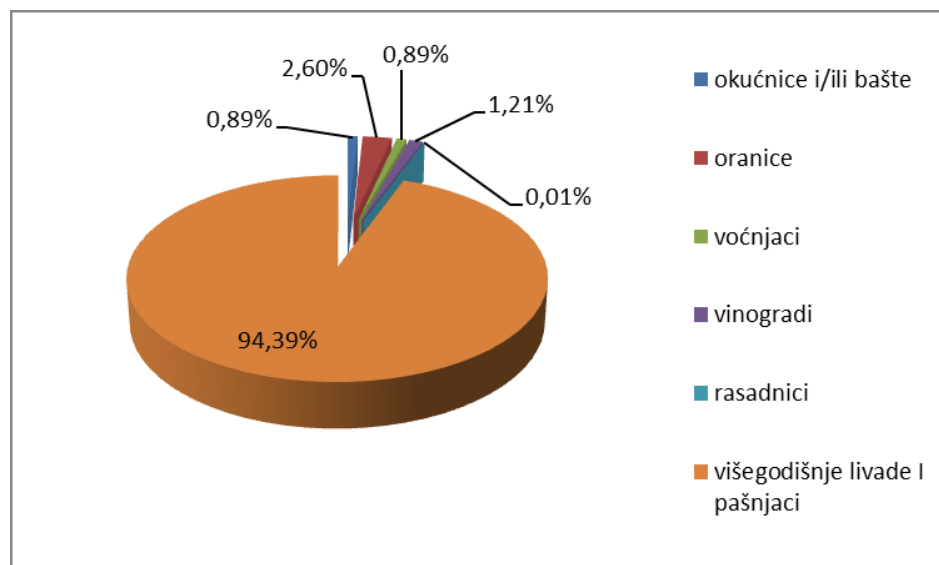
2.3. Obim i struktura poljoprivredne proizvodnje

Površina poljoprivrednog zemljišta u Crnoj Gori iznosi 309.241 ha, što predstavlja 22,4% njene teritorije. Od ove površine, 95,2% pripada individualnim poljoprivrednim gazdinstvima, a ostatak od 4,8% poslovnim subjektima. Imajući u vidu ukupan broj stanovnika, Crna Gora sa 0,49 ha poljoprivrednog zemljišta po stanovniku spada u grupu evropskih zemalja sa značajnim zemljišnim resursima za razvoj poljoprivrede. Međutim, ukupne poljoprivredne površine ne mogu se potpuno valorizovati. To je posledica izražene orografije i geološkog sastava, koji su uslovili da preovlađuju uglavnom plitka zemljišta niske proizvodne vrednosti. Osim toga, značajan procenat neobradivih površina čine pašnjaci (**Grafik 1** i **Tabela 2**). Takođe, poljoprivredno zemljište je usitnjeno i raspoređeno na veliki broj porodičnih gazdinstava. Od ukupnog poljoprivrednog zemljišta, 31,6% čine parcele površine do 0,50 ha. Više od polovine gazdinstava (54,1%) koristi 0,1–1 ha poljoprivrednog zemljišta, a, čak, 73% porodičnih gazdinstava poseduje površinu manju od 2 ha. Samo 0,9% porodičnih gazdinstava ima parcele veće od 100 ha i to uglavnom u severnom regionu (Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja, 2015).

Tabela 2. Poljoprivredno zemljište po kategorijama korišćenja za period 2012–2014. godine.

	2012	2013	2014
Ukupno korišćeno poljoprivredno zemljište (ha)	222 890,6	223 131,0	230 321,2
Korišćene okućnice/baste (ha)	2 028,8	1 992,1	1 832,4
Korišćene oranice (ha)	5 716,1	5 812,1	6 898,4
Vinogradi (ha)	2 697,0	2 701,8	2 703,3
Voćnjaci plantažni (ha)	999,6	1 004,2	1 099,6
Voćnjaci–ekstenzivni (ha)	966,2	970,7	1 156,8
Rasadnici (ha)	32,1	32,1	47,3
Višegodišnje livade i pašnjaci (ha)	210 450,8	210 618,0	216 583,4

Izvor: Statistički godišnjak Crne Gore (2015)

Grafik 1. Struktura korišćenog poljoprivrednog zemljišta u Crnoj Gori u 2013. godini.

Izvor: Statistički godišnjak Crne Gore (2014)

2.4. Voćarstvo u Crnoj Gori

Statistički podaci (Statistički godišnjak Crne Gore, 2015) pokazuju da se u Crnoj Gori iz godine u godinu povećavaju površine pod voćnjacima. U periodu od 2012. do 2014. godine, te površine su sa 1.965,8 ha uvećane na 2.256,4 ha. Ovo povećanje površina obezbeđeno je, pre

svega, kroz različite programe podrške poljoprivrednim proizvođačima, posebno u severnim regionima, koji su prepoznati kao područja pogodna za gajenje jabučastih voćnih vrsta.

Prema podacima Sektorske studije za voće i povrće (2014) najveći udeo u voćarstvu Crne Gore beleži proizvodnja agruma (24,4%) i šljive (24,2%). Agrumi su najzastupljenije voće južne regije, a najveće učešće ima mandarina koja se u značajnoj meri uzgaja plantažno i plasira na inostranom tržištu. U severnoj regiji, dominantna voćna vrsta je šljiva koja se uglavnom koristi za proizvodnju rakije, dok se manji deo konzumira u svežem stanju, suši ili prerađuje u džemove i slatko. Proizvodnja jabuke sa učešćem od 15,8% i smokve sa 11,1% takođe je značajna. Osim breskve, maline, jagode i agruma, ostale voćne vrste se uglavnom ekstenzivno gaje, uglavnom na okućnicama i bez primene agrotehničkih mera. Može se reći da crnogorski sektor voćarstva karakteriše velika usitnjenost parcela, odnosno mali broj plantažnih zasada (**Tab. 3 i 4**). Uglavnom su zastupljeni manji zasadi ili uzgoj voća na okućnicama, prevashodno za sopstvenu potrošnju, a nešto manje za tržište.

Tabela 3. Proizvodnja voća u Crnoj Gori u 2014. godini.

	Proizvodnja ukupno (t)	Proizvodnja na plantažama (t)
Šljiva	5 743,2	1 976,4
Jabuka	4 900,0	2 656,0
Mandarina	4 181,0	3 204,4
Kruška	914,8	180,7
Breskva	1 356,4	1 276,1
Maslina	796,2	253,8

Izvor: Statistički godišnjak Crne Gore (2015)

Tabela 4. Proizvodnja voća na plantažama u 2014. godini.

	Ukupna površina (ha)	Prinos po hektaru (t)
Šljiva	278,8	9,7
Jabuka	193,0	20,1
Mandarina	146,2	23,1
Kruška	35,8	5,3
Breskva	95,1	13,5
Maslina	120,6	3,1

Izvor: Statistički godišnjak Crne Gore (2015)

U Crnoj Gori, posle šljive, jabuka je najznačajnija voćna vrsta. Rejonizacija i razvojni planovi u voćarstvu predviđaju povećanje površina pod jabučastim voćnim vrstama, posebno u severnim regionima. Na ovom području još uvek su zastupljene autohtone sorte jabuke (Petrovača, Budimka, Kolačara, Kožara, Pazarka, Ljutača i dr.), kao pojedinačna stabla ili u vidu manjih zasada. Ove sorte su se tokom dugog vremenskog perioda prilagodile postojećim agroekološkim uslovima (dugovečnost, otpornost na mraz, sneg, sušu i patogene) i imaju određeni privredni značaj (Božović i sar., 2015).

Mijušković (2002) naglašava da dobri zemljišni uslovi, povoljan raspored padavina u toku godine i relativno visoka vlažnost vazduha i u letnjim mesecima, pružaju mogućnost za razvoj voćarstva, posebno u opštinama u Polimlju (Berane, Bijelo Polje, Andrijevica, Pljevlja). To se odnosi ne samo na povećanje broja stabala, već i na poboljšanje sortnog sastava, sa ciljem da se iz jedne ekstenzivne proizvodnje pređe na savremeni uzgoj voćaka. Međutim, kvalitetnije sorte imaju istovremeno veće zahteve za negom i uslovima, a isto tako su i osetljive prema raznim bolestima i štetočinama, o čemu se posebno mora voditi računa.

2.5. Rasprostranjenost i značaj *E. amylovora*

Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al. je prva opisana fitopatogena bakterija i sigurno jedna od najviše proučavanih u istoriji fitopatologije. Bakteriozna plamenjača koju ova bakterija prouzrokuje prvi put je zapažena krajem 18. veka na američkom kontinentu, na osetljivim sortama kruške, jabuke i dunje, koje su u Ameriku doneli prvi doseljenici iz Istočne Evrope i Jugozapadne Azije (van der Zwet and Keil, 1979). Prva pojava sušenja voćnih stabala uočena je u državi Njujork, iz koje se bolest postepeno širila na susedne oblasti, zahvatajući sve voćarske regione. Početkom 19. veka, bakteriozna plamenjača postaje veliki problem u voćarskoj proizvodnji u mnogim državama Amerike.

Više od 100 godina nije se znao uzročnik ove bolesti, a njena pojava je pripisivana fitopatogenim gljivama, insektima, čak i meteorološkim faktorima. Mnogi istraživači bavili su se ovim problemom, ali je tek 1878. godine profesor T. Burill, sa Univerziteta u Ilinoisu, potvrdio bakterioznu prirodu bolesti (van der Zwet and Keil, 1979). Nekoliko godina kasnije bakterija je opisana pod imenom *Micrococcus amylovorus*, a svoj sadašnji naziv i mesto u klasifikaciji dobila je 1920. godine.

Dvadeseti vek predstavlja period intenzivnog širenja *E. amylovora* u mnogim zemljama. Nakon što je prouzrokovala katastrofalne štete u zasadima kruške u Kaliforniji, u periodu 1901—1909. godine (Bonn and van der Zwet, 2000), bakterija je preko Pacifika, sadnim materijalom prenetu u Japan (Uyeda, 1903, prema: Panić i Arsenijević, 1996), a potom i na Novi Zeland (1919). Ubrzo zatim, 1921. godine, identifikovana je u Meksiku, na jabuci i krušci. U Evropi je

najpre opisana 1957. godine u Engleskoj i vrlo brzo je zahvatila i ostale zemlje Srednje i Zapadne Evrope: Holandiju i Poljsku (1966), Dansku (1968), Nemačku (1971), Francusku i Belgiju (1972), Švedsku i Norvešku (1986), Čehoslovačku (1987) i Švajcarsku (1989) (Boon and van der Zwet, 2000).

Devedesetih godina prošlog veka bakterija se proširila na područje Mediterana, Balkanskog poluostrva i Bliskog istoka, pa je tako prvi put zapažena u Egiptu (1962—1964), a zatim i na Kipru (1984), Izraelu i Turskoj (1985) i Grčkoj (1986) (Boon and van der Zwet, 2000). Na teritoriji zemalja bivše Jugoslavije bolest se pojavila najpre u Makedoniji 1989. godine (Panić i sar., 1989, prema: Panić i Arsenijević, 1996). Zvanično prisustvo ove bakterije u bivšoj Jugoslaviji potvrđeno je 1990. godine (EPPO Reporting Service, 1991; Panić i Arsenijević, 1996). Već tada, prisustvo bakteriozne plamenjače je utvrđeno i u Srbiji (Panić i Arsenijević, 1996; Gavrilović i Arsenijević, 1998) i Bosni i Hercegovini (Arsenijević i sar., 1991). U Crnoj Gori je *E. amylovora* prvi put zabeležena 1993. (Panić i Arsenijević, 1996), u Hrvatskoj 1995. (Cvjetković i sar., 1999), a u Sloveniji 2001. godine (Dreo et al., 2006).

Prema podacima EPPO (2012), *E. amylovora* je danas prisutna u više od 50 zemalja u svetu i zbog svoje štetnosti nalazi se na karantinskoj EPPO A2 listi.

Ekonomski značaj bakteriozne plamenjače će se ubuduće verovatno povećavati, pre svega zbog njenog širenja u nove regione gajenja jabuke i kruške. Iako je ova bolest poznata više od 200 godina, još uvek nema efikasnih baktericida niti zadovoljavajućeg i efikasnog programa suzbijanja koji bi mogao da se preporučuje za primenu u poljskim uslovima (Psallidas and Tsiantos, 2000). Noviji sistemi uzgoja jabuke koji podrazumevaju korišćenje osetljivih podloga (M.26 i M.9) i osetljivih sorti (Gala, Braeburn), doprinose širenju bolesti (Nicholson and Beckerman, 2008). Najkomercijalnije sorte jabuke koje su uvedene u proizvodnju poslednjih godina (Braeburn, Fuji, Gala, Ginger Gold, Jonagold, Pink Lady) istovremeno su i najosetljivije na bakterioznu plamenjaču (Norelli et al., 2003).

Zbog svega navedenog, bakteriozna plamenjača danas ima veliki karantinski značaj. U zemljama u kojima nije prisutna sprovode se striktne karantinske mere u cilju sprečavanja njenog unošenja i širenja. Jedna od najvažnijih mera u kontroli bakteriozne plamenjače je gajenje otpornijih sorti i podloga (Norelli et al., 2003; Korba et al. 2008).

2.6. Domaćini

E. amylovora ima široki krug domaćina i napada približno oko 200 vrsta iz 40 rodova. Prvenstveno je poznata kao patogen biljaka iz fam. *Rosaceae* (van der Zwet and Keil, 1979). U okviru ove familije bakterija parazitira vrste iz podfamilija *Maloideae* (*Pomoideae*), *Rosoideae*, *Amygdaloideae* (*Prunoideae*) i *Spiroideae* (Momol and Aldwinckle, 2000). Najveći broj biljaka

domaćina sa utvrđenim prirodnim infekcijama pripada podfam. *Maloideae*, a manji broj njih je u okviru podfam. *Rosoideae* i *Amygdaloideae* (Momol and Aldwinckle, 2000). Rodovi u okviru podfam. *Spiroideae* definisani su na bazi veštačkih inokulacija (van der Zwet and Keil, 1979).

Najznačajniji domaćini bakterije u okviru *Maloideae* (*Pomoideae*) su voćne vrste: kruška (*Pyrus* spp.), jabuka (*Malus* spp.), dunja (*Cydonia* spp.), mušmula (*Mespilus* spp.), kao i mnoge ukrasne biljke i vrste iz spontane flore: glog (*Crataegus* spp.), dunjarica (*Cotoneaster* spp.), vatreni trn (*Pyracantha* spp.), oskoruša (*Sorbus* spp.), merala (*Amelanchier* spp.), japanska mušmula (*Eriobotrya* spp.), stranvezija (*Stranvaesia* spp.), japanska dunja (*Chaenomeles lagenaria*), fotinija (*Photinia* spp.). Ove vrste imaju najveći ekonomski i epidemiološki značaj kada je u pitanju *E. amylovora*, s obzirom da ona na njima prezimljava i nanosi im najveće štete (Smith et al., 1988). U podfam. *Rosoideae*, *E. amylovora* inficira malinu i kupinu (*Rubus* spp.), ukrasne biljke iz roda *Cowania*, kao i vrste iz rodova *Potentilla*, *Geum* i *Dryas*. U okviru podfam. *Amygdaloideae* Rosen and Groves (1928) potom i Mohan and Thomson (1996), navode da bakterija inficira vrstu *Prunus salicina* (japanska šljiva) (Momol and Aldwinckle, 2000). Veštačke infekcije vrste *Spiraea vanhouttei* iz podfam. *Spiroideae*, takođe su rezultirale pojavom simptoma bakterijske plamenjače, a kao domaćini bakterije navode se i vrste iz rodova *Physocarpus*, *Aruncus* i *Holodiscus* (van der Zwet and Keil, 1979).

Sojevi *E. amylovora* klasifikovani su u tri grupe: sojevi poreklom iz *Maloideae*, sojevi iz *Rubus* i sojevi „Hokkaido“ (Asian pear – *Pyrus pyrifolia*). Glavni kriterijum za razlikovanje ovih grupa je njihova specijalizacija prema domaćinu i genetska raznolikost dobijena na osnovu molekularnih analiza. Dodatno, u okviru svake od ovih grupa postoje podgrupe koje su diferencirane primenom različitih biohemijskih i molekularnih tehnika (Momol and Aldwinckle, 2000). Većina sojeva *E. amylovora* izolovanih iz *Maloideae* su patogeni za jabuku, krušku i druge *Maloideae* i *Prunus*, ali ne i za *Rubus*. Sojevi izolovani sa *Rubus* vrsta nisu patogeni za jabuku i krušku (Braun and Hildebrand, 2005). Sojevi izolovani iz japanske šljive (Hokkaido, Japan) takođe pokazuju visoku specifičnost prema ovoj vrsti i ne inficiraju jabuku.

U okviru svake grupe osetljivih biljaka domaćina postoje vrste ili sorte koje pokazuju visok stepen otpornosti, uz potpuno odsustvo simptoma bolesti ili sa vrlo ograničenim simptomima (Forsline and Aldwinckle, 2002; Luby et al., 2002). Utvrđena je lista otpornih sorti za najvažnije poljoprivredne kulture (van der Zwet and Keil, 1979; Bellenot–Kapusta et al., 2002).

U različitim zemljama i klimatima postoje biljke domaćini na kojima ova bakterija prezimljava i koje služe kao izvor inokuluma („rezervoir hosts“). U Južnoj Evropi i Mediteranu to su pretežno divlje *Pyrus* vrste (*P. amygdaliformis*, *P. syriaca*), u Severnoj i Centralnoj Evropi *Crataegus* (*C. oxyacantha*, *C. monogyna*), a širom Evrope to su ukrasne vrste rodova *Pyracantha*, *Cotoneaster* i *Sorbus* (Momol and Aldwinckle, 2000).

Na teritoriji zemalja bivše Jugoslavije *E. amylovora* je do sada utvrđena na 10 domaćina (kruška, divlja kruška, jabuka, dunja, mušmula, oskoruša, glog, vatreni trn, dunjarica i japanska dunja) (Balaž et al., 2013). U Srbiji, bakterija je prvo otkrivena 1990. godine na krušci (*Pyrus*

communis) i dunji (*Cydonia oblonga*), a zatim i na jabuci (*Malus domestica*), mušmuli (*Mespilus germanica*) i glogu (*Crataegus* sp.) (Panić i Arsenijević, 1996). Kasnije, bolest je otkrivena i na ukrasnim biljkama, na vatrenom trnu (*Pyracantha coccinea*) 1997. godine (Gavrilović i Arsenijević, 1998), a u periodu od 2000—2007. godine eksperimentalno je potvrđena i kao parazit ukrasnih biljaka iz rodova *Cotoneaster*, *Chaenomeles* i *Sorbus* (Balaž i Smiljanić, 2004; Gavrilović i sar., 2007). Gavrilović (2010) navodi da se u domaće spонтane flore mogu ubrajati i pojedinačna samonikla stabla jabučastih voćaka izvan zasada, kao i njihove divlje forme.

2.7. Simptomi bolesti

Simptomi bakteriozne plamenjače su karakteristični i lako prepoznatljivi. Sam naziv bolesti opisuje i njen osnovni simptom — nekrozu i izumiranje tkiva. Razvoj nekroze u direktnoj je vezi sa progresivnim kretanjem bakterije kroz biljno tkivo. Pojava bakterijskog eksudata na površini inficiranog tkiva takođe je karakterističan simptom bakteriozne plamenjače (van der Zwet and Keil, 1979; Vanneste and Eden-Green, 2000).

Parazit napada sve delove voćaka: cvetove, listove, plodove, mladare, tanje i deblje grane, deblo, čak i koren i korenov vrat (Arsenijević, 1997), pa, prema tome, postoji pet različitih stupnjeva ispoljavanja bolesti (Turechek, 2004).

Simptomi bolesti najuočljiviji su u proleće, u periodu posle cvetanja, pa do sredine leta. Prvi simptomi javljaju se rano, na pojedinačnim cvetovima ili čitavim cvastima koje postaju vodenaste, a zatim tamno zelene. U periodu od 5—10 dana cvetovi dobijaju mrku, potom crnu boju, smežuravaju se i suše, otpadajući ili ostajući da vise na granama (palež cvetova — „blossom blight”) (van der Zwet and Keil, 1979). Sa cvetova patogen prelazi na cvetne drške i tek formirane plodiće. Na formiranim nesazrelim plodovima javljaju se prvo vlažne zone inficiranog tkiva, a zatim dolazi do nekroze mrke ili crne boje. Sa obolelih cvetova infekcija se širi i na listove, obično u vidu hlorotičnih vlažnih zona i putem lisnih nerava prelazi na lisnu peteljku i mladara. Obolelo lišće se deformiše, osuši i ostaje da visi na granama.

U povoljnim uslovima za razvoj bolesti, na obolelom tkivu lista, osim kapljica bakterijskog eksudata, mogu se uočiti i bakterijske niti u vidu paperjaste mase (van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1999).

Infekcija plodova ostvaruje se direktno kroz lenticele na kori, kroz povrede ili preko obolelih rodni grančica. Razvoj bolesti na plodovima redovno je praćen pojavom bakterijskog eksudata, koji iz obolelog tkiva izbija u vidu kapljica (Panić i Arsenijević, 1996). Oboleli plodovi pocrne, smežuravaju se i suše i zajedno sa lišćem ostaju dugo da vise na rodni grančicama.

Sa obolelih cvetova i listova patogen prelazi na mladare i grančice (palež mladara — „shoot blight”). Karakterističan znak bolesti je savijanje zaraženih mladara pri vrhu, u vidu

pastirskog štapa („shepherd’s crook”) (van der Zwet and Keil, 1979). U uslovima povećane vlažnosti, na obolelim letorastima uočavaju se kapljice bakterijskog eksudata beličaste ili žućkaste boje, a tkivo na prelazu između zdravog i obolelog dela postaje crvenkaste boje i ispunjeno gumastom masom (Agrios, 2005). Crni mladari zajedno sa lišćem, cvetovima i plodovima, izgledaju kao plamenom spaljeni, pa otuda i potiče naziv bolesti.

Na starijim granama nastaju rak-rane („canker blight”), koje su posledica prisustva i razmnožavanja bakterije u tkivu drveta. Bakterija prezimljava u nastalim rak-ranama, zadržavajući svoju vitalnost (Smith et al., 1988). Rak-rane mogu prstenasto obuhvatiti obolele grane i prouzrokovati njihovo izumiranje, iznad mesta nekroze. Ukoliko se nekrotični proces razvija i na deblu, tada može nastati izumiranje čitave vočke (Smith et al., 1988; Panić i Arsenijević, 1996).

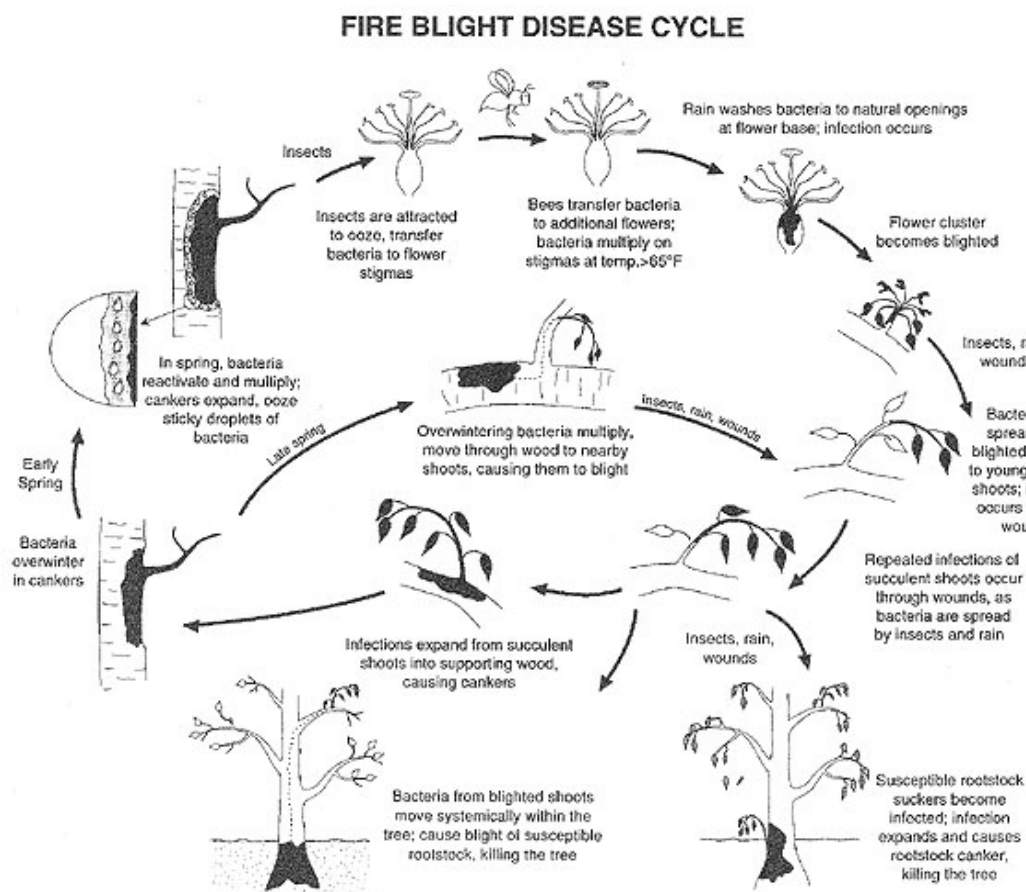
„Trauma blight” je tip simptoma koji se manifestuje jakim i iznenadnim infekcijama lišća, plodova i stabla, koje nastaju obično nakon oštećenja izazvanih gradom ili olujnim vetrovima (Turechek, 2004).

Zaraza pri osnovi ili na prizemnom delu stabla („rootstock blight”) nastaje kada bakterija sa inficiranih cvetova i mladara dospe do ovih delova. Simptomi se ispoljavaju u vidu tamnih i vlažnih, ljubičastih nekroza kore, a ispod kore, u unutrašnjosti tkiva, uočava se crveno-mrka nekroza sprovodnih sudova. Zaraze korenovog vrata i korena nisu najčešća faza bolesti, ali su najdestruktivnije za obolele vočke i u većini slučajeva prouzrokuju njihovo brzo i potpuno propadanje već u prvoj godini infekcije ili najkasnije 2—3 godine nakon infekcije. Ovaj vid simptoma najčešće nastaje kada se prilikom kalemljenja koriste obolele podloge, a većina njih je osetljiva na *E. amylovora* (Gavrilović i sar., 2008).

Simptomi bakterijske plamenjače na ukrasnim i spontanim vrstama generalno su slični promenama koje se javljaju na jabučastim vočkama. Postoje razlike u detaljima koje su uslovljene, pre svega, genetskim osobenostima vrste, kao i specifičnim klimatskim faktorima u kojima se ona nalazi (Panić i Arsenijević, 1996).

2.8. Epidemiološko—ekološke karakteristike *E. amylovora*

Obolele vočke predstavljaju osnovni izvor zaraze. Bakterija *E. amylovora* prezimi u kori zaraženih grana, na ivicama rak-rana koje su nastale u prethodnoj vegetaciji (Panić i Arsenijević, 1996). Smatra se da je primarni inokulum kojim započinje prolećni ciklus bolesti obezbeđen prenošenjem bakterije iz prezimelih, prošlogodišnjih rak-rana, putem vetra, kišnih kapi ili aktivnošću insekata, na otvorene cvetove (Steiner, 2000a) (**Grafik 2**).



Grafik 2. Ciklus razvoja *Erwinia amylovora* –

E. Gotham, Cornell University.

(Izvor: www.nysaes.comell.edu)

U proleće, sa kretanjem vegetacije i povećanjem temperature (iznad 18°C) bakterija nastavlja svoj razvoj, umnožavajući se i formirajući kolonije po obodu rak-rana i u susednoj kori. Kiša lako spira bakteriju sa eksudata na rak-ranama do cvetova i listova. U geografskim područjima sa čestim kišama tokom cvetanja voćaka, čak i kad eksudat nije prisutan, bakterija se lako spira kišnim kapima, posebno sa gornjih na donje delove krune (Beer and Norelli, 1977).

Oboleli plodovi, kao i grane ostavljene na zemlji posle rezidbe voćaka, takođe mogu biti mesta na kojima bakterija prezimljava. *E. amylovora* se može održati i kao epifit na raznim organima voćaka, ne prouzrokujući simptome bolesti. Epifitsko prisustvo bakterije na površini pojedinih organa (cvetovi, lišće, grane, plodovi, pupoljci i dr.), objašnjava nastanak zaraze jakog stepena i pojavu epifitocija i u slučajevima kada nema inokuluma u vidu eksudata, kada je mali

broj prezimelih aktivnih rak-rana i kada nema pojave bolesti u prethodnoj godini (Panić i Arsenijević, 1996).

Širenje bakterije sa zaraženih na zdrave biljne organe, omogućavaju insekti, kišne kapi, vetar, ptice, kao i čovek svojim aktivnostima. Smatra se da insekti imaju najveću i najznačajniju ulogu u prenošenju bakterije *E. amylovora*. Među prenosiocima bakterije su potkornjaci, mravi, domaća pčela, domaća muva, zelena jabukina vaš, mala kruškina lisna buva, krvava vaš i dr. Van der Zwet and Beer (1999) navode da najveći značaj u širenju bakteriozne plamenjače imaju *Xylosandrus germanus* (Blfd), *Formica* sp., *Aphis pomi* DeGeer, *Aphis mellifera* L., *Musca domestica* L., *Psylla* spp., *Scolytus rugulosus* (Muller), *Adelphocoris rapidus* (Say), *Typhlocyba pomaria* McAtee i *Eriosoma lanigerum* (Hausm.). Pčele prenose bakteriju prilikom oprašivanja, sa jednog inficiranog cveta na ostale cvetove, kao i na većim rastojanjima. S obzirom da ovi insekti imaju veliku ulogu u oprašivanju jabučastih voćaka, to su one i najznačajniji vektor *E. amylovora* (Panić i Arsenijević, 1996).

Čovek svojim aktivnostima učestvuje u prenošenju *E. amylovora*: tokom proizvodnje sadnog materijala, uvozom i transportom obolelog sadnog materijala, korišćenjem ambalaže i transportnih sredstava, prilikom obavljanja agrotehničkih radova u voćnjaku (priborom za rezidbu koji nije dezinfikovao, voćarskim alatom, poljoprivrednim mašinama, rukama, odećom, obućom) (Panić i Arsenijević, 1996).

E. amylovora može preživeti u nesterilnom zemljištu nekoliko nedelja, ali dugoročno preživljavanje u zemljištu je manje verovatno (Vanneste and Paulin, 1990).

Ptice selice su takođe označene kao vektori bakterije. Smatra se da su ptice odigrale glavnu ulogu u prenošenju bakterije sa ostrva Velike Britanije na kontinentalni deo Evrope. U Danskoj je potvrđeno da glog (*Crataegus* spp.) koji je jedan od domaćina bakterije, služi kao sklonište za veliki broj ptica, kao što su čvorak (*Sturnus vulgaris*), brezov zviždak (*Phylloscopus trochilus*) i drozd (*Turdus musicus*). *E. amylovora* je preneti njihovom migracijom iz Engleske u Dansku za 2–3 dana (van der Zwet and Keil, 1979).

2.9. Uticaj meteoroloških faktora na pojavu bolesti

Vremenski uslovi su verovatno najznačajniji faktor u razvoju i širenju bakteriozne plamenjače (van der Zwet and Keil, 1979). Osim prisustva virulentnog patogena i osetljive biljke domaćina, pojava bolesti u prvom redu zavisi od meteoroloških faktora, kao što su optimalne temperature, učestale kiše, visoka vlažnost vazduha. Meteorološki faktori često određuju da li će se bolest na nekom području pojaviti ili ne. Poznavajući meteorološke faktore u jednom voćarskom rejonu, moguće je predvideti u kojoj meri oni omogućavaju pojavu bolesti u njenoj najdestruktivnijoj formi ili da je, suprotno, rizik od pojave bolesti mali.

Smatra se da je minimalna temperatura za pojavu i razvoj bakteriozne plamenjače 18,5 °C, maksimalna 32–35 °C, dok optimum za razvoj bolesti predstavljaju temperature 21–27 °C. Bakterija *E. amylovora* ima viši temperaturni optimum za rast (28–30 °C), pa se infekcije češće uočavaju kasno u proleće ili u rano leto (Janse, 2006). Presudan značaj u pojavi i štetnosti bakteriozne plamenjače imaju temperature i relativna vlažnost vazduha tokom kritičnog perioda cvetanja jabučastih voćaka (Turechek, 2004). Do infekcije cvetova dolazi za vreme toplih dana (sa temperaturom oko 25 °C), koji su praćeni čestim padavinama ili visokom vlažnošću (>70%), maglom ili rosom. U takvim uslovima brži je razvoj bakterije, a zeljasti biljni organi brže rastu i njihovi međućelijski prostori su zasićeni vodenom parom, što sve utiče na povećanu osetljivost biljke prema patogenu. Međutim, vrlo često i u uslovima sa limitiranim kišnim padavinama dovoljna je površinska navlaženost biljnih tkiva da podstakne razvoj bolesti (van der Zwet and Beer, 1999).

Predviđanje, tj. prognoza, pojave bakteriozne plamenjače bazira se upravo na praćenju maksimalnih, minimalnih i srednjih dnevnih temperatura, kao i padavina u vreme cvetanja voćaka. Zahvaljujući razvoju više prognostičkih sistema, kao što su Maryblight (Steiner, 1990), BIS (Billing's integrated system, Billing, 1999) i drugi, omogućena je kontrola bolesti i redukovana primena pesticida (Janse, 2006).

2.10. Patogene odlike *E. amylovora*

Bakterija *E. amylovora* je izraziti polifag jer parazitira veliki broj biljnih vrsta iz različitih rodova i familija (van der Zwer and Keil, 1979). Uprkos tome, ne postoje definisani patovari, bazirani na patogenosti prema pojedinim domaćinima, niti su opisani biovari na osnovu biohemijsko–fizioloških razlika. Ipak, postoje u literaturi dva izvora o taksonomskoj različitosti ove bakterije definisanoj na osnovu patogenosti prema pojedinim domaćinima (Momol and Aldwinckle, 2000). Prvi podatak dali su Starr et al. (1951), koji su predložili da se sojevi patogeni za *Rubus* imenuju kao *E. amylovora* f. sp. *rubi*. Drugi podatak dao je Goto (1990), koji je izolovao sojeve iz japanske kruške (*Pyrus pyrifolia*), koji nisu bili patogeni za jabuku. On je na osnovu toga zaključio da se radi o posebnom patovaru ove bakterije. RAPD analize sojeva *E. amylovora* (Momol et al., 1997) pokazale su da se oni na osnovu specijalizacije prema domaćinu mogu podeliti u 3 grupe: *Maloideae* sojevi koji nisu patogeni za *Rubus* vrste, *Rubus* sojevi patogeni samo za *Rubus* vrste i *Hokkaido* sojevi patogeni za krušku i ograničene patogenosti prema jabuci (Momol and Aldwinckle, 2000).

Test patogenosti uključuje inokulaciju mogućih biljaka domaćina ili njihovih delova (Schaad et al., 2001; Jones and Geider, 2001). Na nesazrelim plodovima kruške dolazi do nekroze sa pojavom kapi bakterijskog eksudata 3–4 dana nakon inokulacije. Na plodovima

šljive javlja se nekroza i eksudat dva dana nakon inokulacije, dok se na plodovima kajsije javlja samo nekroza tkiva bez pojave eksudata. Inokulacijom plodova limuna izostaje bilo kakva reakcija, za razliku od bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, koja ima sličan izgled kolonija na hranljivoj podlozi i koja takođe prouzrokuje hipersenzitivnu reakciju na duvanu i muškatli (Panić i Arsenijević, 1996).

Bakterija *E. amylovora* prouzrokuje i nekrozu sejanaca jabuke i kruške, u vidu nekroze kotiledonih listova i hipokotila u roku od 48 sati posle inokulacije (Gavrilović i Arsenijević, 1998).

Većina sojeva *E. amylovora* prouzrokuje hipersenzitivnu reakciju na listovima duvana i muškatele u vidu nekroze ili potpunog kolapsa nakon 24 h (Jones and Geider, 2001).

2.11. Morfološke odlike *E. amylovora*

E. amylovora je gram–negativna asporogena bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*. Morfološke odlike sojeva *E. amylovora* su uglavnom ujednačene i karakteristične za vrstu (Paulin, 2000). Postoje neke specifičnosti u pogledu bojenja po Gramu. Većina sojeva ove bakterije je gram–negativna, međutim Hayward i Waterson su još 1965. godine otkrili nekoliko sojeva koji se u pojedinim slučajevima boje gram–pozitivno (Panić i Arsenijević, 1996). Bakterija se kreće uz pomoć cilija (flagela), a njihovo formiranje, kao i kretanje bakterije zavise od temperaturnih uslova (opt. 18–25 °C) i pH vrednosti (opt. pH 6–9) (Raymundo and Ries, 1980, prema: Panić i Arsenijević, 1996). Raspored cilija je peritrih, mada je Rosen 1926. godine objavio svoje nalaze po kojima ova bakterija poseduje samo jednu polarnu ciliju. Danas je međutim poznato da pojedinačne ćelije nekih sojeva imaju po jednu bočnu, a ne polarnu ciliju (Panić i Arsenijević, 1996). Dužina flagela premašuje dužinu same ćelije, a njihov broj varira od 5 do 8 (Paulin, 2000).

Oblik bakterijskih ćelija je dosta uniforman, u vidu kratkih zaobljenih štapića, uglavnom pojedinačnih, ređe u parovima, a veoma retko u kraćim nizovima ili lancima, po maksimalno 3–4 ćelije zajedno (Panić i Arsenijević, 1996). Prosečna veličina ćelije iznosi 0,3 x 1–3 µm i varira u zavisnosti od uslova za rast (van der Zwet and Keil, 1979). Neki autori navode da postoje razlike u veličini ćelija između virulentnih i avirulentnih izolata ove bakterije. Istraživanja na sojevima sa prostora bivše Jugoslavije potvrdila su da virulentniji sojevi imaju krupnije ćelije (Panić i Arsenijević, 1996). Bakterijska kultura najčešće sadrži mešavinu kapsuliranih i nekapsuliranih ćelija (Bennett and Billing, 1978). Opisana su dva tipa ćelija: normalne (1–2,5 µm x 0,8–1,2 µm) i filamentozne (7–35 µm x 0,8–1,2 µm), kod kojih su ćelije i do 10 puta duže (Paulin, 2000).

2.12. Odgajivačke odlike *E. amylovora*

E. amylovora formira kolonije karakterističnih boja i oblika na većini hranljivih podloga (Bereswill et al., 1998). Prema Schaad et al. (2001), za izolaciju i diferencijaciju *E. amylovora* mogu se koristiti standardne i selektivne hranjive podloge: mesopeptonska podloga sa 5% saharoze (NSA) (Billing et al., 1961), King B podloga (Paulin and Samson, 1973), CCT podloga (Ishimaru and Klos, 1984), CG podloga (Crosse and Goodman, 1973), MS podloga (Miller and Schroth, 1972) i MM2Cu podloga (Bereswill et al., 1998).

Na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (NAS), nakon tri dana razvoja u termostatu, kolonije su okrugle, ispupčene i sjajne, 3–4 mm u prečniku, ravnih ivica, bele do krem boje. Izrazito su ispupčene i sluzaste konzistencije, što je znak stvaranja levana, složenog makromolekula polisaharidne prirode, koji nastaje razlaganjem saharoze. Narednih dana razvoja kolonije gube konzistenciju, postaju sluzaste i spajaju se preko cele površine podloge (Panić i Arsenijević, 1996). Na King B podlozi kolonije su bele, okrugle i sluzaste. Na ovoj podlozi *E. amylovora* ne stvara fluorescentni pigment (Schaad et al., 2001), za razliku od *Pseudomonas syringae* koja fluorescira. Stoga se ove dve pomenute podloge koriste i kao diferencijalne za izolovanje *E. amylovora* i preporučuju se za izolovanje ove bakterije (Gavrilović, 1998; Sobiczewski et al, 1997).

Vrlo često se za izolaciju *E. amylovora* koristi CCT podloga na kojoj bakterija nakon tri dana razvoja formira providne, sluzave kolonije, 4–7 mm u prečniku, svetlo plave boje. Ova podloga obezbeđuje i dobar nivo selektivnosti u odnosu na *Erwinia herbicola* i *Pseudomonas* sp. koje su često sa njom u asocijaciji u nekrotiranom biljnom tkivu (Paulin, 2000). Na selektivnoj CG podlozi, kolonije *E. amylovora* su posle četiri dana razvoja krupne, ispupčene, sa karakterističnim udubljenjima nalik kraterima (Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001). Na MS podlozi kolonije su crveno–narandžaste, a na MM2Cu podlozi kolonije su žute, izrazito sluzaste, ili manje sluzaste kod nekih sojeva (Schaad et al., 2001).

E. amylovora se razvija u temperaturnom intervalu 5–30 °C, sa optimumom na 27 °C (Schaad et al., 2001). Na temperaturi od 36 °C, kao i u tečnoj podlozi sa 7% natrijum hlorida nema razvoja bakterije (Arsenijević, 1997).

2.13. Biohemijsko–fiziološke odlike *E. amylovora*

E. amylovora ispoljava izrazitu aktivnost u pogledu korišćenja različitih izvora ugljenika i azota u podlozi, što je proučavano od strane mnogih autora (van der Zwet and Keil, 1979; Lelliot

and Stead, 1987; Klement et al., 1990; Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001). Sojevi *E. amylovora* razlažu glukozu, fruktozu, galaktozu, saharozu i slična ugljenikova jedinjenja, stvarajući kiselinu. Ne hidrolizuju laktozu, maltozu, dekstrin, inulin, eskulin, skrob. Glukozu metabolišu i u aerobnim (oksidativno), ali i pri anaerobnim uslovima (fermentativno), što je veoma važan test u diferenciranju između rodova *Pseudomonas*, *Xanthomonas* i *Erwinia*. Ova bakterija transformiše većinu organskih kiselina: mravlju, maleinsku, oksalnu, limunsku, mlečnu, propionsku i sirćetnu. Bakterija stvara ferment katalazu, ali ne i oksidazu, fosfatazu, lipazu (Tween 80), ureazu, pektolitičke fermente, ni arginin–dehidrolazu, hidrolizuje želatin, ne stvara amonijak, ne redukuje nitrata i ne stvara vodonik–sulfid iz cisteina.

2.14. Serološke odlike *E. amylovora*

Serološke metode se već duže vreme koriste u proučavanju ove bakterije. Serološki testovi se prvenstveno primenjuju u područjima u kojima nema referentnih sojeva ili nisu dostupne molekularne metode. Prvi podaci o serološkim karakteristikama *E. amylovora* dobijeni su primenom poliklonalnih, a zatim i monoklonalnih antitela. Najobimnija proučavanja seroloških osobina roda *Erwinia* izvršili su Slade i Tiffin, 1984. godine. Oni su potvrdili da postoje veoma kompleksni različiti antigeni koji čine antigenu strukturu *E. amylovora*. Prepoznato je nekoliko antigena koji se mogu nezavisno pripremiti iz čiste kulture ove bakterije: antigen označen kao LPS, zatim neutralni toplotno stabilni antigen GAI i antigen TV prisutan samo u virulentnim sojevima. Još jedan kompleksni antigen GAI detektovan je u ekstracelularnoj sluzi iz bakterijske kulture (Paulin, 2000).

Razvijeno je nekoliko seroloških tehnika za dijagnozu i detekciju *E. amylovora*: aglutinacija, imunodifuzija, test imunofluorescencije (IF) i ELISA test (Lelliott and Stead, 1987; Schaad et al., 2001). Test aglutinacije uglavnom obezbeđuje dobre rezultate (zgrušavanje i formiranje pahuljastog taloga) oslanjajući se na visoku homogenost termostabilnih antigena u *E. amylovora* i svojstvu bakterije da u prisustvu specifičnih antitela stvara makromolekule u vidu taloga (Lelliott and Stead, 1987). Ovaj test je veoma praktičan i jednostavan za izvođenje i u laboratoriji i u poljskim uslovima, pri čemu nije potrebna prethodna izolacija niti inkubacija (Arsenijević i sar., 1994; Jovanović, 1999). Međutim, zbog pojave ukrštene reakcije sa drugim različitim bakterijama, potrebni su i dodatni testovi za dobru identifikaciju (Paulin, 2000).

Test imunofluorescencije je standardna serološka tehnika koja se koristi za detekciju bakterije i koja markira bakterijske ćelije direktnim posmatranjem kroz mikroskop (Paulin, 2000). Ovo je metoda koja se bazira na reakciji specifičnih antitela sa bakterijskom ćelijom kao antigenom. Ta reakcija vizualizuje se pomoću fluorescentnog mikroskopa. IF je jedina metoda

koja kombinuje imunološku reakciju sa posmatranjem ćelijskih osobina (Paulin, 2000; Schaad et al., 2001; Janse, 2006).

Adaptaciju ELISA testa za detekciju *E. amylovora* izvršili su Laroche and Verhoyen (1984). Razvijeno je više različitih tehnika ove metode (direktna ELISA i DASi — double antibody sandwich indirect) (Gorris et al., 1996), koje se baziraju na prepoznavanju bakterijskih antigena pomoću specifičnih antitela. Tokom izvođenja ovog testa, u više koraka inkubacije prati se vezivanje specifičnih antitela sa antigenima, a detekcija nastalog kompleksa vrši se pomoću enzimske reakcije sa supstratom (Paulin, 2000; Schaad et al., 2001; Janse, 2006). Primena ELISA testa preporučuje se za identifikaciju bakterije u simptomatskim uzorcima, zbog toga što biljna tkiva sa simptomima uglavnom sadrže visoku populaciju ovog patogena ($>10^5$ CFU/ml) (Schaad et al., 2001). Paulin (2000) ističe da je ELISA relativno brza i automatizovana metoda, kojom je subjektivnost u oceni rezultata svedena na najmanju moguću meru. ELISA je specifična, veoma osetljiva metoda, posebno pogodna u analizi velikog broja uzoraka (Gorris et al., 1996).

2.15. Molekularne odlike *E. amylovora*

Dugo se smatralo da je *E. amylovora* homogena vrsta i u ranijim istraživanjima nije pronađena nijedna karakteristika koja bi mogla razlikovati sojeve u odnosu na poreklo sa različitih geografskih područja, biljke domaćine ili vreme izolacije. Na osnovu detaljnih studija roda *Erwinia* korišćenjem samo sojeva sa *Maloideae*, Dye (1968) nije našao velike razlike u biohemijskim karakteristikama. U serološkim ispitivanjima (bez *Rubus* i *Hocaido* sojeva), Elrod (1941) zaključuje da je *E. amylovora* veoma homogena vrsta. Tek početkom 90-ih godina prošlog veka, primenom molekularnih metoda, proučena je genetska raznolikost ove bakterije i utvrđen diverzitet među sojevima, što danas ima veliki značaj za praćenje razvoja vrste u vremenu i prostoru, identifikaciju mogućih izvora infekcije, mapiranje gena i identifikaciju pojedinačnih sojeva. Rano evidentiranje diverziteta sojeva posebno je značajno za razumevanje epidemiologije vrste (Momol and Aldwinckle, 2000).

Dugo vremena su molekularne metode bile bazirane na umnožavanju fragmenata DNK unutar plazmida veličine 29 kb, označenog kao pEA29, za koji se smatralo da je prisutan u svim sojevima *E. amylovora*. Zbog toga je i veliki broj opisanih metoda zasnovan upravo na umnožavanju ove plazmidske DNK (Bereswill et al., 1992; McManus and Jones, 1995b; Llop et al., 2000). Međutim, otkriće izolata u Španiji 1996. godine, koji nije posedovao ovaj plazmid, dovelo je u pitanje pouzdanost ove metode. Zahvaljujući postojanju hromozomske DNK u bakterijskoj ćeliji (Tortora et al., 2004), Obradović i sar. (2007) razvili su novu molekularnu metodu i uspešno sintetisali prajmere (FER1-F i FER1-R') za umnožavanje hromozomske

sekvence DNK veličine 1269 bp, specifične za *E. amylovora*, što je omogućilo detekciju i onih sojeva bakterije koji ne poseduju plazmid pEA29.

Danas se za detekciju *E. amylovora* može koristiti više različitih PCR metoda. Bereswill et al. (1992) koristili su proizvoljne A i B prajmere u PCR reakciji za detekciju ove bakterije. Llop et al. (2000) razvili su Nested-PCR proceduru korišćenjem dva para prajmera istovremeno u jednoj tubi, čime su postigli veću specifičnost i osetljivost u izvođenju ovog testa. Amplifikacija DNK regiona lociranog između repetitivnih palindromičnih sekvenci (REP), enterobakterijskih repetitivnih intergenskih konsenzusa (ERIC) i BOX elemenata, uz pomoć istoimenih prajmera, jedna je od prvih tehnika primenjenih u pručavanju genetskog diverziteta *E. amylovora* (Versalovic et al., 1991, 1994; McManus and Jones, 1995b). Upravo je ova tehnika omogućila lako razlikovanje izolata poreklom sa *Rubus* i *Pomoideae*. I drugi istraživači primenili su rep-PCR metodu u pručavanju ove bakterije (Louws et al., 1999; Barionovi et al., 2006; Rico et al., 2008).

Momol et al. (1997) su u pručavanju genetskih varijacija *E. amylovora* primenili RAPD (Random amplified polymorphic DNA) tehniku, korišćenjem RAPD prajmera. Proučavanjem 16 sojeva poreklom iz USA, Evrope i Japana, oni su primenom ove tehnike uočili razlike na osnovu kojih su sojeve klasifikovali u okviru tri grupe: *Maloideae*, *Rubus* i Hokkaido. RAPD tehniku u pručavanju *E. amylovora* koristili su i drugi autori u svojim istraživanjima (Manulis et al., 1998; Taylor and Hale, 1998; Brennan et al., 2002; Keck et al., 2002; Pulawska et al., 2006).

U epidemiološkim pručavanjima *E. amylovora* u Italiji Minardi et al. (2000) primenili su AFLP tehniku (Amplified fragment length polymorphism) umnožavanja amplikona nastalih u PCR reakciji, korišćenjem restrikcionih enzima, specifičnih za sečenje amplikona na tačno određenim mestima.

Značajni rezultati u diferencijaciji sojeva *E. amylovora* dobijeni su tehnikom elektroforeze u pulsirajućem električnom polju (PFGE — Pulsed field gel electrophoresis) (Zhang and Geider, 1997; Jock et al., 2002). Ova tehnika omogućava elektroforetsku migraciju molekula DNK, naizmeničnom promenom pravca električnih impulsa, što obezbeđuje efikasnije razdvajanje velikih fragmenata DNK, a zatim i njihovo međusobno upoređivanje. Rezultati dobijeni primenom ove tehnike omogućili su grupisanje sojeva *E. amylovora* u šest osnovnih grupa i praćenje njihovog širenja u Evropi. U Srbiji, Ivanović i sar. (2010, 2012) primenili su PFGE tehniku u pručavanju 40 sojeva iz Srbije i jednog soja iz Crne Gore.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U definisanju ciljeva istraživanja pošlo se od činjenice da u Crnoj Gori do sada nisu sprovedena istraživanja o *Erwinia amylovora*, kao i da je malo literaturnih podataka o njenoj pojavi. Simptomi bakteriozne plamenjače prvi put su zapaženi 1993. godine, na krušci, u opštinama Berane i Andrijevica (Panić i Arsenijević, 1996), a epifitotičnu pojavu na dunji, na više lokaliteta, zabeležili su Obradović i sar. (2003). Od tada nema podataka o pojavi i širenju ove bakterije u Crnoj Gori.

Iz navedenih razloga, ukazala se potreba za istraživanjem koje će dati potpuniji pregled i nove rezultate u pogledu statusa bakterije na ovom području, posebno imajući u vidu njen značaj, štetnost i karantinski status u zemljama u okruženju. Istraživanje na terenu usmereno je, pre svega, na utvrđivanje prisustva, rasprostranjenosti i kruga domaćina *E. amylovora* na različitim lokalitetima u Crnoj Gori. S obzirom da teritorija Crne Gore obuhvata regione sa izraženim razlikama u pogledu klime i reljefa, jedan deo istraživanja usmeren je na ispitivanje uticaja različitih meteoroloških faktora na pojavu simptoma bakteriozne plamenjače i epidemiologiju bakterije.

Pažnja je posvećena i utvrđivanju štetnosti *E. amylovora* na pojedinim voćnim vrstama, ukrasnim biljkama i biljkama iz spontane flore, koje su domaćini bakterije, sa ciljem da se utvrdi koja je voćna vrsta najugroženija i koje vrste iz spontane flore predstavljaju izvore inokuluma.

Kroz laboratorijski rad urađena je izolacija bakterije iz velikog broja prikupljenih biljnih uzoraka i izvršena njena identifikacija. Poseban segment istraživanja predstavlja proučavanje karakteristika dobijenih bakterijskih izolata, odnosno njihova karakterizacija, primenom standardnih bakterioloških testova, a zatim i seroloških i molekularnih metoda. Primena više različitih molekularnih tehnika omogućila je bolje proučavanje genetskog diverziteta bakterije. Otkrivanje razlika u genetskoj strukturi sojeva poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta u Crnoj Gori ima poseban značaj u sagledavanju heterogenosti populacije *E. amylovora* na ovom prostoru.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Lokaliteti ispitivanja pojave i rasprostranjenosti bakterije

Monitoring fitopatogene bakterije *Erwinia amylovora*, u cilju utvrđivanja njenog prisustva i rasprostranjenosti, sproveden je u trogodišnjem periodu — od 2012. do 2015. Odabrani su lokaliteti za istraživanje, tako što su prvo pregledani najznačajniji voćarski regioni u zemlji (u severoistočnom i zapadnom delu zemlje), u kojima je primećeno prisustvo simptoma sličnih bakterioznoj plamenjači, i koji su, prema ranije objavljenim podacima, poznati po prisustvu bakterije.

Pregledane su teritorije opština Bijelo Polje, Berane, Andrijevica, Plav i Rožaje, u severoistočnom delu zemlje, kao i opštine Nikšić, Pljevlja, Žabljak, Šavnik i Plužine, u zapadnom i severnom delu zemlje. Nakon toga, pregled je proširen i na opštine u centralnom (Kolašin, Mojkovac, Danilovgrad, Podgorica i Cetinje) i južnom delu zemlje (Bar, Ulcinj, Budva, Tivat, Kotor i Herceg Novi), tako da je praktično obuhvaćena čitava teritorija države.

4.2. Domaćini bakterije, ocena štetnosti i simptomi

Zdravstveni pregled u cilju evidentiranja simptoma bakteriozne plamenjače, bio je usmeren prvenstveno na jabučaste voćne vrste kao najvažnije domaće bakterije (dunja, jabuka, kruška i mušmula). Monitoring je obuhvatio i ukrasne biljke iz rodova *Cotoneaster* (polegla dunjarica), *Pyracantha* (vatreni trn) i dr., kao i biljke spontane flore iz rodova *Crataegus* (glog), *Chaenomeles*, *Sorbus* i dr., koje su takođe opisane kao važni domaćini *E. amylovora* i vrste na kojima se ova bakterija održava.

Pregledani su voćni zasadi, kao i brojna pojedinačna stabla jabučastog voća na okućnicama. Pojava oboljenja je praćena i na vrstama divlje kruške i jabuke, kao i na biljkama spontane flore (glog), na utrinama i neobrađenim površinama, pored puteva, a evidentirana je i njihova udaljenost od zasada pod jabučastim voćem. Pregled je bio usmeren i na usamljena stara stabla dunje, jabuke i kruške, na međama i utrinama, koja mogu biti značajan izvor inokuluma za osvarenje novih infekcija. Posmatrano je moguće prisustvo simptoma na ukrasnim vrstama: polegloj dunjarici, vatrenom trnu i sl.

Pregled je obavljan dva puta u toku svake istraživačke godine, u prolećnom (april—jun) i u jesenjem periodu (tokom septembra). Zdravstveni pregledi u proleće vršeni su nakon cvetanja osetljivih voćnih vrsta i nastavljani tokom intenzivnog porasta mladara, u cilju otkrivanja simptoma bakteriozne plamenjače. Jesenji pregledi obavljeni su u cilju pronalaženja rak-rana na stablima i identifikacije zaraženih zasada i područja (Panić i Arsenijević, 1996).

Prilikom obilaska terena posmatrane su promene na biljkama u vidu nekroze i sušenja pojedinih biljnih organa (nekroza cvetova, plodića, mladara, lišća), kao i promene na granama i deblu voćaka u vidu pucanja kore i rak-rana.

Vizuelnim pregledom zaraženih stabala određen je procenat zahvaćenosti krune voćaka, na osnovu skale od 1 do 10, po kojoj ocena 10 pokazuje potpuno odsustvo simptoma, a ocena 1 pokazuje da je stablo mrtvo usled delovanja *E. amylovora* (van der Zwet and Keil, 1979) (**Tab. 5**).

Tabela 5. Ocena procentualne zahvaćenosti stabla bakterioznom plamenjačom (van der Zwet and Keil, 1979).

Ocena	Zaraženi izdanci (%)
10	bez simptoma
9	1–3%
8	4–6%
7	7–12%
6	13–25%
5	26–50%
4	51–75%
3	76–88%
2	89–99%
1	100%

Sa obolelih biljaka prikupljani su biljni uzorci sa simptomima karakterističnim za bakterioznu plamenjaču, radi laboratorijskih proučavanja. Zabeležen je lokalitet i datum prikupljanja uzoraka, kao i biljka domaćin i sorta.

4.3. Praćenje uticaja meteoroloških faktora na pojavu bolesti

Tokom trogodišnjeg perioda istraživanja prikupljani su osnovni meteorološki podaci (srednje dnevne temperature, relativna vlažnost vazduha i količina padavina), pomoću automatskih meteoroloških stanica METOS (Pessl Instruments), postavljenih na odgovarajućim

lokalitetima, za potrebe Savjetodavne službe u biljnoj proizvodnji, stručne službe Ministarstva poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore. Lokaliteti sa postavljenim meteo–stanicama su: Bijelo Polje (severoistočni, planinski region), Nikšić (zapadni, planinski region), Podgorica (centralni, ravničarski region) i Bar (južni, primorski region) (**Grafikon 2**).



Grafikon 2. Mapa Crne Gore sa lokalitetima meteo–stanica.

Istovremeno sa meteorološkim podacima vršeno je praćenje fenofaza u razvoju dunje, jabuke i kruške, na pomenutim lokalitetima. Na osnovu dobijenih podataka o temperaturi, vlažnosti vazduha i količini padavina, u pojedinim fenofazama, evidentirani su datumi sa povoljnim uslovima za infekciju, na posmatranim lokalitetima. Poseban akcenat bio je na praćenju zaraza u fazi cvetanja ovih voćnih vrsta, kao presudnih za pojavu i širenje bolesti (Panić i Arsenijević, 1996; Steiner, 2000a).

Praćenje pojave simptoma bakteriozne plamenjače vršeno je u prolećnom periodu (april, maj i jun), na navedenim osetljivim voćnim vrstama i vrstama spontane flore, u severnim, centralnim i južnim delovima zemlje, koji imaju izražene klimatske razlike.

4.4. Izolacija bakterije

Laboratorijski rad je obuhvatio izolaciju bakterije iz prikupljenih biljnih uzoraka, u cilju njene identifikacije. Primenom standardnog bakteriološkog postupka, iz uzoraka sa simptomima, izvršene su izolacije na mesopeptonsku podlogu (MPA) i na hranljivu podlogu obogaćenu sa 5% saharoze – Nutrient Sucrose Agar (NSA) (Lelliott and Stead, 1987; Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001). Bakterija je izolovana iz fragmenata listova, lisnih i cvetnih drški, cvetova, plodova i mladara, uzetih na prelazu između zdravog i obolelog tkiva. Biljni materijal je prvo ispiran u tekućoj vodi i prosušen, a zatim su isecani sitni fragmenti koji su macerirani u sterilnoj destilovanoj vodi. Dobijena suspenzija, primenom standardnog metoda izolacije, razmazom je naneta na površinu hranljive podloge. Nakon 48 h razvoja u termostatu na temperaturi 26–27 °C, pojedinačne kolonije bakterije presejavane su na zakošenu mesopeptonsku podlogu sa 2% glicerola (NAG), radi dobijanja čistih kultura, koje su održavane u frižideru, na temperaturi od 4 °C (Klement et al., 1990; Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001).

Bakterijske kulture povremeno su presejavane na svežu podlogu, radi održavanja. U svim testovima korišćene su kulture bakterije gajene 24 h na podlozi, pri temperaturi 26–27 °C.

Za dalje proučavanje odabrano je 60 dobijenih bakterijskih izolata (**Tab. 6**).

Kao kontrolni sojevi u testovima, korišćeni su determinisani sojevi bakterija (**Tab. 7**).

Tabela 6. Proučavani izolati *E. amylovora* poreklom iz Crne Gore.

R. br.	Šifra soja	Domaćin	Lokalitet	Naselje	Biljni organ
1.	EaM 1	Dunja	Bijelo Polje	Potkrajci	mladar
2.	EaM 2	Dunja	B. Polje	Potkrajci	mladar
3.	EaM 3	Dunja	B. Polje	Potkrajci	cvet
4.	EaM 4	Dunja	B. Polje	Potkrajci	cvet
5.	EaM 5	Dunja	B. Polje	Rasovo	mladar
6.	EaM 6	Dunja	B. Polje	Rakonje	mladar
7.	EaM 7	Dunja	B. Polje	Zaton	cvet
8.	EaM 8	Dunja	B. Polje	Loznice	cvet
9.	EaM 9	Dunja	B. Polje	Kisjele Vode	cvet
10.	EaM 10	Dunja	B. Polje	Ravna Rijeka	list
11.	EaM 11	Dunja	Berane	Budimlja	mladar
12.	EaM 12	Dunja	Berane	Vinicka	mladar
13.	EaM 13	Dunja	Berane	Donja Rženica	list
14.	EaM 14	Dunja	Berane	Buče	list
15.	EaM 15	Dunja	Berane	Poda	cvet
16.	EaM 16	Dunja	Berane	Petnjica	mladar
17.	EaM 17	Dunja	Berane	gradska zona	mladar
18.	EaM 18	Dunja	Plav	Pepići	cvet
19.	EaM 19	Dunja	Cetinje	Strugari	mladar
20.	EaM 20	Dunja	Andrijevića	Slatina	mladar
21.	EaM 21	Dunja	Andrijevića	Trešnjevo	mladar
22.	EaM 22	Dunja	Nikšić	Liverovići	cvet
23.	EaM 23	Dunja	Nikšić	Gornje Polje	cvet
24.	EaM 24	Dunja	Nikšić	Mokra Njiva	cvet
25.	EaM 25	Dunja	Nikšić	Vidrovan	list
26.	EaM 26	Dunja	Pljevlja	Đurđevića Tara	cvet
27.	EaM 27	Dunja	Mojkovac	gradska zona	cvet
28.	EaM 28	Jabuka	B. Polje	Potkrajci	mladar
29.	EaM 29	Jabuka	B. Polje	Potkrajci	plodić
30.	EaM 30	Jabuka	B. Polje	Kisjele Vode	starija grana
31.	EaM 31	Jabuka	B. Polje	R. Rijeka	plodić
32.	EaM 32	Jabuka	Berane	Budimlja	mladar
33.	EaM 33	Jabuka	Berane	Vinicka	mladar
34.	EaM 34	Jabuka	Berane	Petnjica	mladar
35.	EaM 35	Jabuka	Andrijevića	Kralje	mladar
36.	EaM 36	Jabuka	Plav	Pepići	mladar
37.	EaM 37	Jabuka	Nikšić	G. Polje	mladar

Nastavak tabele 6.

R. br.	Šifra soja	Domaćin	Lokalitet	Naselje	Biljni organ
38.	EaM 38	Jabuka	Nikšić	M. Njiva	mladar
39.	EaM 39	Jabuka	Nikšić	Vidrovan	starija grana
40.	EaM 40	Kruška	B. Polje	Potkrajci	list
41.	EaM 41	Kruška	B. Polje	K. Vode	mladar
42.	EaM 42	Kruška	B. Polje	R. Rijeka	starija grana
43.	EaM 43	Kruška	Berane	Lubnice	mladar
44.	EaM 44	Kruška	Berane	Lubnice	mladar
45.	EaM 45	Kruška	Berane	gradska zona	cvet
46.	EaM 46	Kruška	Berane	gradska zona	mladar
47.	EaM 47	Kruška	Andrijevića	Slatina	plodići
48.	EaM 48	Kruška	Nikšić	Liverovići	mladar
49.	EaM 49	Kruška	Nikšić	Liverovići	mladar
50.	EaM 50	Kruška	Nikšić	Liverovići	plod
51.	EaM 51	Kruška	Nikšić	G. Polje	starija grana
52.	EaM 52	Kruška	Nikšić	M. Njiva	plod
53.	EaM 53	Kruška	Bar	Mrkojevići	mladar
54.	EaM 54	Kruška	Bar	Mrkojevići	mladar
55.	EaM 55	Mušmula	B. Polje	Rasovo	mladar
56.	EaM 56	Mušmula	B. Polje	Rasovo	mladar
57.	EaM 57	Glog	B. Polje	K. Vode	mladar
58.	EaM 58	Glog	B. Polje	K. Vode	cvet
59.	EaM 59	Glog	Berane	Petnjik	mladar
60.	EaM 60	Glog	Berane	Petnjik	cvet

Tabela 7. Kontrolni sojevi bakterija korišćeni u istraživanjima.

Šifra soja	Bakterija	Test	Kolekcija
KP X-7	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv. campestris</i>	O/F test Hidroliza skroba Hidroliza eskulina Hidroliza tween-a	D. Radunović
S-1	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	Hipersenzitivna reakcija duvana Aktivnost oksidaze Hidroliza želatina Redukcija nitrata	dr V. Gavrilović
Ps. f.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fluorescencija na KB podlozi Redukcija nitrata	D. Radunović
Pm-3	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Aktivnost oksidaze	dr V. Gavrilović
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Reakcija po Gramu	PFNS
Ea-208	<i>Erwinia amylovora</i>	Biohemijsko-fiziološke odlike	dr V. Gavrilović
BUT 3/1	<i>Erwinia amylovora</i>	Odgajivačke odlike Biohemijsko-fiziološke odlike	dr J. Balaž
NCPBP 595	<i>Erwinia amylovora</i>	Odgajivačke odlike Biohemijsko-fiziološke odlike Sero-loške i molekularne odlike	NCPBP
CFBP 1430	<i>Erwinia amylovora</i>	Odgajivačke odlike Biohemijsko-fiziološke odlike Sero-loške i molekularne odlike	CFBP

PFNS - Poljoprivredni fakultet N. Sad, Srbija

NCPBP - National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK

CFBP - Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, France

4.5. Test patogenosti

4.5.1. Inokulacija plodova kruške i šljive

Patogenost dobijenih izolata proveravana je inokulacijom nesazrelih plodova kruške sorte Viljamovka, kao i plodova šljive sorte Stenlej (Arsenijević, 1988; Panić i Arsenijević, 1996). Infiltracija bakterijske suspenzije koncentracije 10^8 CFU/ml izvršena je ubodom pomoću bakteriološke igle. Inokulisani plodovi postavljeni su u plastične kutije sa vlažnim filter papirom i inkubirani u uslovima visoke vlažnosti, na temperaturi od 25 °C. Posmatran je razvoj nekroze na plodovima i pojava bakterijskog eksudata, 3–5 dana nakon inokulacije (Lelliott and Stead, 1987; Klement et al., 1990; Arsenijević, 1992). Plodovi inokulisani sterilnom destilovanom vodom korišćeni su kao negativna kontrola (Arsenijević, 1997).

4.5.2. Hipersenzitivna reakcija

Hipersenzitivna reakcija ispitana je na listovima duvana sorte White Burley i na listovima muškatle (*Pelargonium* sp.). Korišćena je bakterijska suspenzija pripremljena u sterilnoj destilovanoj vodi (koncentracije 10^8 CFU/ml), koja je medicinskom iglom uneta u mezofil lista, u međunervalni prostor na naličju lista. Pozitivna reakcija u vidu nekroze lisnog tkiva praćena je tokom 24 h nakon inokulacije (Klement et al., 1990). Kao pozitivna kontrola korišćen je *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a kao negativna kontrola inokulacija sterilnom vodom.

4.6. Morfološke odlike proučavanih izolata

Oblik bakterijskih ćelija posmatran je pomoću svetlosnog mikroskopa (BTC, BIM-312 T, uvećanje 1000 x), korišćenjem imerzionog objektiva. Razlikovanje bakterije po Gramu proučeno je pomoću reakcije izolata sa 3% KOH (Suslow et al., 1982; Arsenijević i Jovanović, 1995). Jedan pun zahvat bakterijske kolonije, stare 24 h, prenet je bakteriološkom petljom na predmetno staklo i homogenizovan sa jednom kapi 3% KOH. Podizanjem čačalicom posmatrana je pojava „končića” u vidu sluzaste niti, koji je karakterističan za gram-negativne bakterije i nastaje razgradnjom ćelijskog zida bakterijske ćelije pod dejstvom baza (KOH). Kao pozitivna kontrola

korišćen je gram–pozitivni soj *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Schaad et al., 2001).

4.7. Odgajivačke odlike proučavanih izolata

Posmatran je izgled bakterijskih kolonija na različitim hranljivim podlogama, zatim razvoj bakterije u podlozi pri različitim temperaturama, kao i razvoj pri različitim koncentracijama natrijum–hlorida (NaCl) u podlozi.

Kod izgleda kolonija posmatrana je njihova veličina, boja, oblik, površinska struktura, sjaj i izgled oboda (Arsenijević, 1997).

Razvoj bakterije pri temperaturama 34 °C i 36 °C, posmatran je u tečnoj podlozi od kvašćevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) koja je zasejana i postavljena u vodeno kupatilo (Sands, 1990; Jones and Geider, 2001). Zamućenje podloge nakon 3–7 dana znak je pozitivne reakcije tj. razvoja bakterije. Kao kontrola korišćena je nezasejana podloga.

Za proučavanje razvoja bakterije u prisustvu 5% i 7% NaCl, epruvete sa zasejanom podlogom održavane su u termostatu pri temperaturi od 27 °C u trajanju od 3–7 dana. Zamućenje podloge ukazuje na pozitivan rezultat. Kao kontrola korišćene su nezasejane podloge (Sands, 1990).

U ovim testovima, karakteristike ispitivanih izolata poređene su sa referentnim sojevima *E. amylovora* pod šiframa Ea–208, BUT 3/1, NCPPB 595 i CFBP 1430.

4.8. Biohemijsko–fiziološke odlike proučavanih izolata

Ispitane su sledeće biohemijsko–fiziološke odlike: aktivnost oksidaze i katalaze, korišćenje ugljenih hidrata (oksidativno–fermentativni metabolizam glukoze (O/F), stvaranje levana, hidroliza skroba, želatina eskulina i Tween–a 80), korišćenje azotnih jedinjenja (stvaranje amonijaka i redukcija nitrata), osetljivost na streptomycin i hloramfenikol (Lelliott and Stead, 1987; Schaad et al., 2001).

Karakteristike ispitivanih izolata poređene su sa referentnim sojevima *E. amylovora* pod šiframa Ea–208, BUT 3/1, NCPPB 595 i CFBP 1430.

4.8.1. Aktivnost oksidaze

U ovom testu primenjen je Kovačev metod (1956) (Arsenijević, 1988). Staklenim štapićem je zahvaćen manji deo bakterijske kolonije stare 24 h i nanesen na filter papir navlažen sa 1% rastvorom tetrametil–parafenil–fenildiamin–dihidrohlorida. U pozitivnoj reakciji dolazi do pojave tamnoljubičaste boje u roku od 10 do 15 sekundi. Kao pozitivna kontrola korišćen je *Pseudomonas marginalis*, a kao negativna kontrola *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. (Arsenijević, 1988; Sands, 1990).

4.8.2. Aktivnost katalaze

Kao test reagens za dokazivanje stvaranja katalaze korišćen je 20% rastvor vodonik–peroksida (H_2O_2). Bakteriološkom petljom je zahvaćen deo bakterijske kolonije starosti 24 h i emulgovan u kapi H_2O_2 na mikroskopskoj pločici. Pozitivna reakcija u vidu pojave mehurića gasa nastaje kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika, pod uticajem fermenta katalaze (Arsenijević, 1988; Gavrilović, 1998).

4.8.3. Oksidativno–fermentativni metabolizam glukoze

Korišćena je Hugh–Leifson–ova podloga (sa indikatorom bromtimol plavo), kojoj je, nakon sterilizacije i hlađenja do 50 °C, filtracijom dodat sterilisan rastvor glukoze do konačne koncentracije 1%. Zasejavano je po četiri epruvete s podlogom sa svakim ispitivanim izolatom, od čega su po dve epruvete zalivene sterilnim parafinskim uljem radi stvaranja anaerobnih uslova. Pojava žute boje u podlozi nakon tri dana razvoja u termostatu pri 27 °C, označava pozitivnu reakciju, odnosno, razlaganje glukoze od strane bakterije i stvaranje kiseline, usled čega dolazi do promene pH vrednosti podloge. Kao kontrole su korišćene nezasejana podloga i *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* koji glukozu razlaže samo oksidativno (Arsenijević, 1988).

4.8.4. Stvaranje levana

Levan je složeni polisaharid koji nastaje razgradnjom saharoze. Bakterije koje stvaraju levan na podlozi obogaćenoj saharozom formiraju izrazito ispupčene, krupne, sjajne i sluzaste kolonije („levan” tip). Za dokazivanje stvaranja levana korišćena je mesopeptonska podloga obogaćena sa 5% saharoze (Lelliot and Stead, 1987; Arsenijević, 1988).

4.8.5. Hidroliza skroba

Korišćena je MPA podloga sa skrobom, sterilisana i razlivena u Petri šolje. Bakterija je zasejana u vidu četiri spirale. Nakon 5–7 dana razvoja u termostatu, na kolonije se dodaje nekoliko kapi Lugolovog rastvora, koji sadrži jod i koji sa skrobom daje plavu boju. Nestanak plave boje znak je pozitivne reakcije, odnosno razgradnje skroba od strane bakterije (Lelliott and Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

4.8.6. Hidroliza želatina

Odgovarajuća podloga od peptona, kvašćevog ekstrakta i želatina sterilisana je i razlivena u Petri šolje, a zatim zasejana ubodom na četiri mesta. Nakon 5–7 dana razvoja bakterije, podlozi sa bakterijskom kulturom dodaje se Frejzerov reagens koji sadrži živin hlorid. Pojava rastapanja (likvifikacije) podloge očitavana je nakon 3, 7, 14. i 21. dana. Pre očitavanja, podloge su hladene u frižideru pri 4 °C, u trajanju od 30 minuta. U slučaju pozitivne reakcije podloga je tečna i znak je hirolize želatina od strane bakterije (Lelliott and Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je *P. syringae* pv. *syringae*, a kao negativna kontrola nezasejana podloga.

4.8.7. Hidroliza eskulina

Bakterija je zasejana u odgovarajuću podlogu sa eskulinom. Podloga ima plavičasti sjaj (fluorescenciju), koji u slučaju pozitivne reakcije iščezava nakon 48 h, a nakon 7–14 dana boja podloge se menja u tamno–mrku (Arsenijević, 1988). Kao pozitivna kontrola korišćen je *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

4.8.8. Hidroliza Tween–a 80 (estra oleinske kiseline)

Sterilisana podloga kojoj je dodat Tween 80 do konačne koncentracije od 1%, razlivena je u Petri šolje i zasejana bakterijom. Rezultati su očitani nakon sedam dana razvoja pri temperaturi od 27 °C. Pojava beličastog oreola oko bakterijske kolonije ukazuje na stvaranje kristala kalcijum oleata i znak je pozitivne reakcije (Lelliott and Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

4.8.9. Stvaranje amonijaka

Korišćena je podloga od 2% peptona i vode, razlivena u epruvete i sterilisana. Nakon zasejavanja, podloga je održavana u termostatu pri 27 °C. Nakon tri dana razvoja očitani su rezultati dodavanjem kapi Nessler–ovog reagensa. Pojava crveno–narandžastog taloga znak je pozitivne reakcije. Kao kontrola korišćen je amonijum–hidroksid (Gavrilović, 1998).

4.8.10. Redukcija nitrata

Pripremljena je tečna podloga sa 1% natrijum–nitratom. Nakon 10 dana od zasejavanja i razvoja bakterije u termostatu, u podlogu je dodato redom: 1 ml 0,5% rastvora skroba, 1 ml 0,4% rastvora KJ i 5 ml rastvora H₂SO₄. Pozitivna reakcija je trenutna, u vidu pojave tamne boje podloge. Kao negativna kontrola korišćen je *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a kao pozitivna *P. fluorescens* (Sands, 1990).

4.8.11. Osetljivost na streptomycin i hloramfenikol

U podlogu odgovarajućeg sastava, sa dodatkom antibiotika (streptomycin/hloramfenikol), u vidu tablete od 30 mcg, postavljene na površinu podloge, zasejana je bakterija koja je održavana u termostatu pri 27 °C. Pojava zone inhibicije oko antibiotika, u kojoj nema razvoja bakterije, ukazuje na pozitivnu reakciju, odnosno, osetljivost bakterije prema antibiotiku (Schaad et al., 2001).

4.9. Serološke odlike proučavanih sojeva

Za serološko ispitivanje odabrano je 27 sojeva *E. amylovora* (Tab. 8). Primenjene su dve serološke metode: ELISA (enzyme–linked immunosorbent assay) i IF (immunofluorescence) test.

Karakteristike ispitivanih sojeva poređene su sa referentnim sojem bakterije *E. amylovora* (pod šifrom NCPPB 595).

Tabela 8. Sojevi *E. amylovora* korišćeni u ELISA i IF testu.

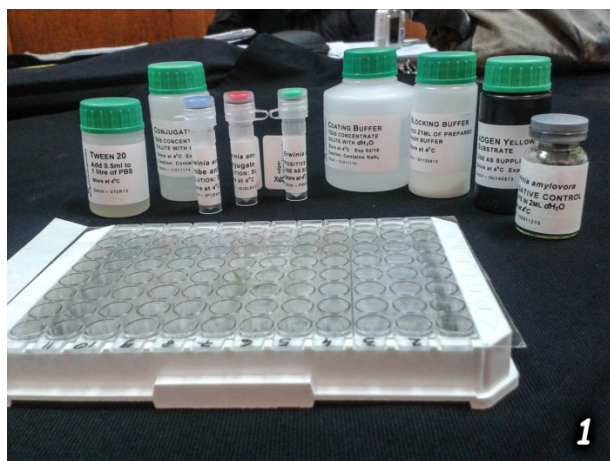
Broj	Šifra soja	Biljka domaćin	Lokalitet
1.	EaM 1	dunja	Bijelo Polje
2.	EaM 11	dunja	Berane
3.	EaM 12	dunja	Berane
4.	EaM 16	dunja	Petnjica
5.	EaM 18	dunja	Plav
6.	EaM 19	dunja	Cetinje
7.	EaM 20	dunja	Andrijevisa
8.	EaM 21	dunja	Andrijevisa
9.	EaM 22	dunja	Nikšić
10.	EaM 23	dunja	Nikšić
11.	EaM 26	dunja	Pljevlja
12.	EaM 28	jabuka	B. Polje
13.	EaM 32	jabuka	Berane
14.	EaM 33	jabuka	Berane
15.	EaM 34	jabuka	Petnjica
16.	EaM 36	jabuka	Plav
17.	EaM 40	kruška	B. Polje
18.	EaM 41	kruška	B. Polje
19.	EaM 44	kruška	Berane
20.	EaM 45	kruška	Berane
21.	EaM 48	kruška	Nikšić
22.	EaM 51	kruška	Nikšić
23.	EaM 53	kruška	Bar
24.	EaM 57	glog	B. Polje
25.	EaM 58	glog	B. Polje
26.	EaM 59	glog	Berane
27.	EaM 60	glog	Berane
28.	NCPB 595	kruška	Velika Britanija

4.9.1. ELISA test

Primenjena je indirektna enzimaska imunoadsorpciona metoda na mikrotitarskoj pločici – Plate Trapped Antigen (PTA) ELISA (Paulin, 2000; Schaad et al., 2001; Janse, 2006). Za rad je korišćen poliklonalni antiserum specifičan za detekciju *E. amylovora* (Identikit PTA General Y, ADGEN Phytodiagnostics, Neogen Europe, Ltd., Scotland, UK) (SI. 1).

Postupak testiranja izveden je prema uputstvu proizvođača, po proceduri za PTA (OEPP/EPPO, 2013). U sterilnoj destilovanoj vodi pripremljena je bakterijska suspenzija koncentracije 10^7 CFU/ml. Uzorci za testiranje pripremljeni su zagrevanjem po 100 μ l bakterijske suspenzije na 100 °C, u trajanju od 10 minuta. U prvom koraku inkubacije u bunarčice mikrotitarske pločice dodato je po 100 μ l svakog ispitivanog bakterijskog izolata, kao i pozitivna i negativna kontrola, koji su prethodno razređeni u puferu za oblaganje pločica („coating buffer”). Nakon perioda inkubacije (tokom noći na 4 °C) tokom kojeg su se uzorci (antigeni) vezali za zidove pločica, izvršeno je ispiranje puferom za ispiranje („wash buffer”), da bi se odstranio višak koji se nije vezao za zidove pločice. Slobodna mesta na pločici blokirana su dodavanjem blokirajućeg pufera („blocking buffer”), a zatim je ponovljen postupak inkubacije (1 sat na 37 °C) i ispiranja. U sledećem koraku u pločicu su dodata specifična antitela (IgG) za detekciju prisustva antigena. Nakon inkubacije (2 sata na 37 °C) i ispiranja, u pločicu su pipetirana specifična antitela konjugovana enzimom alkalna fosfataza. Nakon inkubacije (1 sat na 37 °C) i ispiranja, u poslednjem koraku, u pločicu je dodat supstrat sa enzimom i izvršena inkubacija (1 sat na sobnoj temperaturi). Prisustvo antigena, odnosno pozitivna reakcija enzima sa supstratom u kojoj nastaje slobodni nitrofenol žute boje, registrovano je na osnovu promene boje supstrata.

Dobijeni rezultati očitani su vizuelno, na osnovu promene boje u pločici i na ELISA automatskom čitaču seroloških ploča (Universal Microplate Reader ELx800 BioTek Instruments, USA), merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 405 nm (Sl. 2). Pozitivnom reakcijom su smatrane vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.



Slika 1. Identikit PTA ADGEN Phytodiagnosics za detekciju *E. amylovora*.



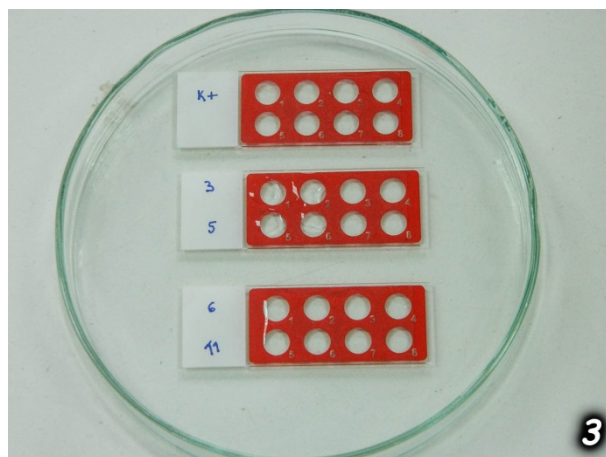
Slika 2. Automatski čitač seroloških ploča Universal Microplate Reader ELx800.

4.9.2. IF test

Test imunofluorescence izveden je po proceduri ADGEN Phytodiagnostics (Neogen Europe, Ltd., Scotland, UK). Primenjena je indirektna metoda imunofluorescence (IIF), sa obeleženim sekundarnim antitelima (Paulin, 2000; Schaad et al., 2001; Janse, 2006).

Postupak testiranja izveden je korišćenjem specifičnih antitela za detekciju *E. amylovora*, prema uputstvu proizvođača, po proceduri za IIF (OEPP/EPPO, 2013). Bakterijska suspenzija koncentracije 10^7 CFU/ml pripremljena je u sterilnoj destilovanoj vodi. Korišćene su mikroskopske pločice sa više antigenih polja (SI. 3). Ispitivani uzorci pipetirani su u po dva polja na pločici u količini od po 20 μ l, kao i pozitivna i negativna kontrola dobijene od proizvođača. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi tokom noći, u pločicu je na svako polje naneto po 20 μ l primarnog specifičnog antitela i inkubirano 25 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije i ispiranja puferom („washing buffer”), u pločicu je na svako polje dodato po 20 μ l FITC konjugata (sekundarna nespecifična antitela označena markerom fluorescein izotiocijanatom). Nakon inkubacije 25 minuta na sobnoj temperaturi i ispiranja, u svako polje pločice dodato je po 5–10 μ l pufera sa glicerinom („mounting medium”).

Vezivanje specifičnih antitela sa bakterijskim antigenima praćeno je uz pomoć fluorescirajućeg markera (FITC), pod fluorescentnim mikroskopom, sa posebnim filterom za fluorescenciju (100x imerzioni objektiv). Pozitivna reakcija je registrovana kao žuto–zelena fluorescencija nastalog kompleksa antigen–antitelo. Očitavanje rezultata, odnosno, detekcija fluorescence, izvršena je pomoću fluorescentnog mikroskopa Olympus BX51 (100x/1.25 imerzioni objektiv) (SI. 4).



Slika 3. Pločice sa antigenim poljima za IF test. **Slika 4.** Fluorescentni mikroskop Olympus BX51.

4.10. Molekularne odlike proučavanih sojeva

Molekularne analize obavljene su u cilju identifikacije i proučavanja genetskog diverziteta bakterije. Za molekularne analize odabrano je 18 sojeva *E. amylovora* poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta, izolovanih u periodu od 2012. do 2015. godine (**Tab. 9**).

Tabela 9. Sojevi *E. amylovora* korišćeni u molekularnim analizama.

Broj	Šifra soja	Biljka domaćin	Sorta	Biljni organ	Lokalitet
1.	EaM 1	dunja	Leskovačka	grana	Bijelo Polje
2.	EaM 11	dunja	Leskovačka	grana	Berane
3.	EaM 12	dunja	Leskovačka	grana	Berane
4.	EaM 13	dunja	Leskovačka	list	Berane
5.	EaM 14	dunja	Leskovačka	list	Berane
6.	EaM 25	dunja	Leskovačka	list	Nikšić
7.	EaM 30	jabuka	Kožara*	grana	B. Polje
8.	EaM 31	jabuka	Jonatan	grana	B. Polje
9.	EaM 37	jabuka	Ajdared	grana	Nikšić
10.	EaM 38	jabuka	Budimka*	grana	Nikšić
11.	EaM 57	glog	/	grana	B. Polje
12.	EaM 58	glog	/	grana	B. Polje
13.	EaM 59	glog	/	grana	Berane
14.	EaM 60	glog	/	grana	Berane
15.	EaM 43	kruška	Junsko zlato	grana	Berane
16.	EaM 48	kruška	Viljamovka	grana	Nikšić
17.	EaM 49	kruška	Crvena Viljamovka	grana	Nikšić
18.	EaM 53	kruška	Santa Marija	grana	Bar

* autohtona sorta

Primenjena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR — Polymerase Chain Reaction), preporučena od strane EPPO za detekciju *E. amylovora* (OEPP/EPPO, 2013). U radu su korišćeni specifični oligonukleotidi (prajmeri) koji su omogućili umnožavanje ciljane sekvence DNK bakterije i *in vitro* sintezu kopija željenog fragmenta. Primenjeno je nekoliko molekularnih tehnika: Nested PCR (korišćenjem dva para prajmera AJ75/AJ76 i PEANT1/PEANT2), rep-PCR (korišćenjem REP, ERIC i BOX prajmera) i RAPD PCR (korišćenjem dva random prajmera CUGEA3 i CUGEA5).

U ovim testovima, karakteristike ispitivanih sojeva poređene su sa referentnim sojem bakterije *E. amylovora* (pod šifrom NCPPB 595).

4.10.1. Izolacija DNK bakterije

Za PCR reakciju korišćene su čiste bakterijske kulture *E. amylovora* gajene na King B podlozi pri 27 °C (Llop i sar., 2000). Bakterijska suspenzija koncentracije oko 10⁸ CFU/ml, napravljena je u sterilnoj destilovanoj vodi. Ekstrakcija DNK iz bakterije izvršena je lizom bakterijskih ćelija u vodenom kupatilu, u trajanju od 10 minuta pri 95 °C. Mikroeprovete sa bakterijskom DNK ohlađene su na ledu i centrifugirane (10 min na 10000 rcf), a supernatant je korišćen za analizu.

4.10.2. Nested PCR

U cilju potvrde identiteta proučavanih sojeva primenjena je Nested PCR, procedura sa umetnutim prajmerima (Llop et al., 2000), specifičnim za detekciju odgovarajuće sekvence od 391 bp na plazmidu pEA29. Ova procedura obezbedila je istovremeno korišćenje dva para prajmera (**Tab. 10**), u istoj PCR tubi, što je bilo moguće s obzirom na njihove različite temperature vezivanja (72 °C za spoljašnje, a 56 °C za unutrašnje prajmere).

Tabela 10. Nested PCR - prajmeri korišćeni za detekciju sojeva *E. amylovora*.

Prajmeri	Sekvence	Literatura
spoljašnji (external) prajmeri:		
AJ 75	5' CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT 3'	McManus and Jones, 1995b.
AJ 76	5' ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA 3'	
unutrašnji (internal) prajmeri:		
PEANT1	5' TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC 3'	Llop et al., 2000.
PEANT2	5' GCA ACC TTG TGC CCT TTA 3'	

PCR smeša ukupne zapremine 50 µl pripremljena je od 31,8 µl sterilne destilovane vode; 1× PCR pufera; 3 mM MgCl₂; 2 µl formamida; 0,2 mM dNTPs; po 0,03 pmol prajmera AJ75 i AJ76; po 10 pmol prajmera PEANT1 i PEANT2; 3 U Taq polimeraze i 1 µl uzorka DNK.

Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša sa sterilnom vodom, bez dodatog uzorka DNK, a referentni soj *E. amylovora* NCPPB 595 korišćen je kao pozitivna kontrola.

Pripremljene tubice sa reakcionom smešom postavljene su u uređaj Thermal Cycler (Applied Biosystems 2720, USA), u kojem je izvedena PCR reakcija po sledećem programu: početna denaturacija DNK na 94 °C u trajanju od 4 minuta, a zatim 25 ciklusa denaturacija na 94

°C u trajanju od 30 sekundi i vezivanje spoljašnjih prajmera na 72 °C — 1 minut. U istom termosajkleru, nakon početne denaturacije na 94 °C u trajanju od 4 minuta, drugi krug amplifikacije sastojao se od 40 ciklusa. Svaki ciklus obuhvatao je denaturaciju pri 94 °C od 30 sekundi, vezivanje unurašnjih prajmera pri 56 °C od 30 sekundi i sintezu na 72 °C od 45 sekundi. Finalna sinteza odvijala se na 72 °C tokom 10 minuta.

Analiza i vizuelizacija nastalih PCR produkata izvršena je nakon elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu i 0,5 x TBE puferu, u uređaju za horizontalnu elektroforezu (BluePower500 SERVA Electrophoresis GmbH), pri konstantnom naponu od 100 V, u trajanju od 45 minuta. Uzorcima je pre unošenja u gel dodat pufer za nalivanje uzoraka („loading buffer”), radi povećanja njihove gustine i bojenja, kako bi se pratilo kretanje DNK tokom elektroforeze. U otvore na gelu uneto je po 5 µl uzorka sa bojom i 3 µl markera. Nakon elektroforeze gel je potopljen u 0,1% rastvor etidijum–bromida, radi vizuelizacije DNK fragmenata. Posmatranje dobijenih produkata izvedeno je u UV transiluminatoru (302 nm). Fotografisanje gelova izvršeno je digitalnim aparatom (Vilber Lourmat, Marne la Vallée Cedex, France). Za poređenje je korišćen komercijalni DNK marker (100 bp DNA Ladder), a pozitivnim je ocenjen PCR test, kojim je detektovan specifični produkt amplifikacije veličine 391 bp.

4.10.3. Rep–PCR

U cilju proučavanja potencijalnih genetičkih varijacija u populaciji *E. amylovora* primenjena je rep–PCR (repetitive extragenic palindromic PCR). Zahvaljujući prisustvu kratkih ponavljajućih sekvenci u genomu bakterije (REP Repetitive Extragenic Palindromic; ERIC Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus i BOX Box elements), korišćeni su REP, ERIC i BOX prajmeri, specifični za ove sekvence (Versalovic et al., 1991, 1994; Louws et al., 1994) (**Tab. 11**). Umnožavanjem jedinstvenih delova DNK bakterije smeštenih između ovih ponavljajućih segmenata, rep–PCR procedura je omogućila razdvajanje sojeva po profilima.

Obavljene su tri nezavisne PCR reakcije sa odgovarajućim prajmerima i PCR smešama zapremine po 25 µl. Sterilna destilovana voda korišćena je kao negativna kontrola, a referentni soj *E. amylovora* (NCPFB 595) kao pozitivna kontrola.

PCR smeša za rep–PCR i ERIC PCR sadržala je 1,3 µl sterilne destilovane vode; 12,5 µl 2X PCR Master Mix-a (Fermentas, Lithuania); 0,2 µl BSA (20 mg/ml); 2,5 µl DMSO; po 3,75 µl prajmera Rep1R-1 i Rep2-1 (20 µM), odnosno, ERIC1R i ERIC2 (20 µM) i 1 µl DNK. PCR smeša za BOX PCR pripremljena je od 5,05 µl sterilne destilovane vode; 12,5 µl 2X PCR Mix-a; 0,2 µl BSA (20 mg/ml); 2,5 µl DMSO; 3,75 µl prajmera BOXAIR (20 µM) i 1 µl DNK. Sastav 2x PCR Master Mix-a bio je 0,05 U/µL Taq DNK polimeraze, 4 mM MgCl₂, po 0,4 mM svakog dNTP i pufer.

Reakcija se odvijala prema sledećem programu: 1 ciklus početna denaturacija na 95 °C u trajanju od 2 minuta, zatim 35 ciklusa denaturacija na 94 °C od 3 sekunde i na 92 °C od 30

sekundi, vezivanje prajmera na 50 °C (za ERIC i BOX PCR) ili 40 °C (REP-PCR) za 1 minut i sinteza na 65 °C za 8 minuta. Finalna sinteza odvijala se na 65 °C u trajanju od 8 minuta.

Nakon elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu (pri naponu od 100 V, u trajanju od 45 minuta) i bojenja etidijum–bromidom, posmatrani su i upoređivani dobijeni profili DNK fragmenata različitih dužina. Za poređenje je korišćen komercijalni DNK marker (DNA Ladder Mix, Fermentas).

4.10.4. RAPD PCR

Genetski diverzitet 18 sojeva *E. amylovora* proučen je i primenom RAPD PCR (Random Amplified Polymorphic DNA PCR) (Momol et al., 1997). Korišćena su dva random prajmera, CUGEA3 i CUGEA5, sa malim brojem baznih parova i niske specifičnosti (**Tab. 11**).

PCR smeša konačne zapremine 20 µl sadržala je: 1× DreamTaq zelenog pufera sa 2 mM MgCl₂ (Fermentas, Lithuania); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; po 0,45 µM prajmera (CUGEA3 i CUGEA5); 0,8 U Taq DNK polimeraze (Kapa Biosystems, SAD) i 2 µl uzorka DNK. Sterilna destilovana voda korišćena je kao negativna, a referentni soj *E. amylovora* (NCPPB 595) kao pozitivna kontrola.

PCR reakcija odvijala se prema sledećem programu: početna denaturacija na 94 °C u trajanju od 2 minuta; 40 ciklusa denaturacije na 94 °C trajanja 1 minut, vezivanja prajmera na 42 °C trajanja 1 minut i elongacije prajmera na 72 °C u trajanju od 2 minuta. Završna elongacija odvijala se na 72 °C u trajanju od 5 minuta.

U dve zasebne RAPD PCR reakcije u termosajkleru, dobijeni su odgovarajući RAPD profili, kod svih proučavanih sojeva. Nakon elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu i bojenja etidijum–bromidom, izvršeno je njihovo posmatranje pod UV svetlom. Za poređenje je korišćen komercijalni DNK marker (DNA Ladder Mix, Fermentas).

Tabela 11. Rep i RAPD PCR - prajmeri korišćeni za diferencijaciju sojeva *E. amylovora*.

Prajmeri	Sekvence	Literatura
Rep1R-1	5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3'	Louws et al. , 1994.
Rep2-1	5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3'	
ERIC1R	5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3'	Louws et al. , 1994.
ERIC2	5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'	
BOXAIR	5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3'	Louws et al. , 1994.
CUGEA3	5' GCGGTACCCG 3'	Momol et al., 1997.
CUGEA5	5' GGAAGCTTCG 3'	Momol et al., 1997.

5. REZULTATI

Rezultati koji su dobijeni tokom ovih istraživanja potvrdili su da je fitopatogena bakterija *E. amylovora* prisutna i široko rasprostranjena u Crnoj Gori, posebno u voćarskim regionima zemlje. Utvrđeno je da razvoju bakterije naročito pogoduju klimatski uslovi kišnog proleća sa optimalnim temperaturama u vreme cvetanja osetljivih voćnih vrsta, koji su karakteristični za severoistočne i zapadne delove zemlje. Uspešnom izolacijom bakterije iz prikupljenih biljnih delova i ispitivanjem njenih patogenih, morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko–fizioloških osobina, potvrđeno je da se radi o vrsti *E. amylovora*. Serološka ispitivanja ukazala su na homogenost proučavanih sojeva. Primenjene molekularne metode otkrile su genetsku različitost ispitivanih sojeva u odnosu na domaćina iz kojeg su izolovani, što je od posebnog značaja za proučavanje genetske strukture i karakteristika populacije *E. amylovora* na ovom području.

5.1. Pojava i rasprostranjenost bakterije na istraživanim lokalitetima

Na osnovu monitoringa sprovedenog na odabranim lokalitetima, koji su obuhvatili čitavu teritoriju države, utvrđeno je da su na jabučastim voćnim vrstama prisutni simptomi bakteriozne plamenjače koju izaziva *E. amylovora*. Prisustvo simptoma je zapaženo prvenstveno u severoistočnom (opštine Bijelo Polje i Berane) i zapadnom delu zemlje (opština Nikšić), gde se nalaze i najznačajniji voćarski rejoni.

Opština Bijelo Polje. Na teritoriji ove opštine simptomi bakteriozne plamenjače prisutni su u gotovo svakom pregledanom zasadu dunje, jabuke i kruške, kao i na brojnim pojedinačnim stablima ovih voćnih vrsta, na okućnicama. Najjače zaraze uočene su na dunji, a slabije na krušci i jabuci. Utvrđeno je prisustvo simptoma i na mušmuli, kao i na glogu, vrsti iz spontane flore. Simptomi su takođe uočeni i na starim zapuštenim stablima jabuke, kruške i dunje, na međama i utrinama pored puteva.

Najveći zasadi jabučastog voća koji su pregledani na ovom području (kako po površini koju zauzimaju, tako i po broju stabala), nalaze se u naselju Potkrajci, na brdovitom terenu, na nadmorskoj visini 600—700 m i u vlasništvu su privatnog preduzeća iz Bijelog Polja. Na ovom potezu pregledani su zasadi dunje, jabuke i kruške. Najjača zaraza uočena je u zasadu dunje starom četiri godine, sa 1000 stabala sorte Leskovačka rana, na površini od oko 6000 m². Vizuelnim pregledom stabala uočeno je prisustvo simptoma bakteriozne plamenjače na gotovo

svakom stablu, u vidu nekroze cvetova i plamenjače mladara sa karakterističnim izgledom „pastirskog štapa” (Sl. 5-7). Intenzitet zaraze u ovom zasadu iznosio je 60%.



Slika 5. Bakteriozna plamenjača mladara na mladom stablu dunje.



Slika 6. Povijanje zaraženog mladara dunje u vidu „pastirskog štapa”.



Slika 7. Nekroza cveta dunje.

Slabija zaraza zapažena je u zasadu jabuke starosti četiri godine, sa 17 000 stabala i nekoliko zastupljenih sorti (Ajdared, Jonagold, Crveni i Zlatni Delišeš, Mucu i Gloster). Simptomi bakteriozne plamenjače uočeni su samo na sorti Ajdared, u vidu nekroze lišća i mladih plodova,

na par stabala jabuke u istom redu (Sl. 8 i 9). U zasadu kruške starosti dve godine, sa 1000 stabala i sortama Viljamovka, Kaluđerka, Santa Marija, Junska lepotica i Butira, simptomi bakteriozne plamenjače su zapaženi samo na par stabala, u vidu nekroze lišća (Sl. 10 i 11).



Slika 8. Nekroza lišća i mladih plodova jabuke.



Slika 9. „Pastirski štap” – savijanje vrha mladara jabuke.



Slike 10 i 11. Crna nekroza lišća na mladom stablu kruške.

Obilaskom i pregledom brojnih pojedinačnih stabala dunje, na okućnicama, u naseljima Rasovo, Rakonje, Zaton, Loznice, Kisjele Vode i Ravna Rijeka, zapaženo je da je svako stablo ove voćne vrste zaraženo i ima simptome bakteriozne plamenjače, u vidu nekroze cvasti i plamenjače mladara (Sl. 12 i 13). U ovim naseljima, na pojedinačnim stablima jabuke autohtonih sorti Kolačara i Kožara, starosti preko 20 godina, uglavnom na okućnicama, ali i na međama pored puteva, uočeni su simptomi u vidu nekroze vrhova mladara i lišća, u znatno manjem obimu nego kod dunje.

U nekoliko pregledanih manjih zasada kruške i jabuke, starosti 7—10 godina, u naseljima Kisjele Vode i Ravna Rijeka, takođe su uočeni simptomi bolesti, a intenzitet zaraze iznosio je 10—15%. Zasad jabuke u naselju Dubovo sa oko 400—500 stabala, druga godina po sadnji, bio je bez simptoma.



Slika 12. Zaraženo stablo dunje.



Slika 13. Nekroza lišća i cvasti dunje.

U naselju Rasovo, na mušmuli (*Mespilus* sp.), na okućnici, bili su prisutni simptomi bakteriozne plamenjače, na cvastima i lišću, u manjem intenzitetu (Sl. 14 i 15).

Simptomi na glogu (*Crataegus* sp.) zapaženi su na biljkama pored puta, u naselju Kisjele Vode, u vidu nekroze grančica i cvasti (Sl. 16 i 17). Zaraženi glog je bio u neposrednoj blizini (100—150 m) zasada kruške sa 200 stabala, starosti sedam godina, koji je takođe imao simptome bakteriozne plamenjače.



Slike 14 i 15. Simptomi bakteriozne plamenjače na lišću i plodu mušmule.



Slike 16 i 17. Simptomi bakteriozne plamenjače na grančicama gloga.

Opština Berane. Na području ove opštine najjače zaraze utvrđene su na dunji, a slabije na krušci i jabuci. Uočeni su simptomi bakteriozne plamenjače i na glogu, vrsti iz spontane flore. Treba istaći da je u pojedinim istraživačkim godinama na ovom području varirao intenzitet zaraze na jabuci i krušci, dok je dunja svake godine imala visok stepen zaraze. Simptomi su uočeni i na pojedinačnim starim stablima divlje kruške i jabuke (**Sl. 18**).



Slika 18. Bakteriozna plamenjača na starom stablu divlje kruške.

Simptomi bakteriozne plamenjače utvrđeni su pre svega, na brojnim pojedinačnim stablima dunje na okućnicama, u naseljima Budimlja, Vinicka, Donja Rženica, Buče, Poda, Pešca, Police (kraj sa više sela), Petnjica, kao i u gradskoj zoni Berana (**Sl. 19 i 20**).

Pojedinačna stabla jabuke (uglavnom sorte Jonatan i Zlatni Delišeš) i kruške (sorte Junsko zlato), takođe su imala simptome bolesti, u vidu nekroze cvasti i lišća kod jabuke (**Sl. 21 i 22**), a kod kruške u vidu plamenjače mladara. Nekoliko manjih zasada kruške (sa po 20—30 stabala), sorte Junsko zlato, u naselju Lubnice, bilo je zaraženo bakterioznom plamenjačom, sa simptomima nekroze cvetova, mladih plodića i plamenjačom mladara. Zasadi jabuke u naseljima Dapsiće (50 stabala, starosti 15—20 godina) i Petnjik (oko 400 sadnica, druga godina po sadnji), bili su bez simptoma bakteriozne plamenjače.



Slike 19 i 20. Plamenjača mladara u krošnji dunje.



Slike 21 i 22. Plamenjača mladara na stablu jabuke.

Na biljkama gloga, na neobrađenom zemljištu pored puta, van naselja Petnjik, takođe su uočeni simptomi bakteriozne plamenjače u vidu nekroze cvasti i grančica sa lišćem (Sl. 23 i 24).



Slike 23 i 24. Simptomi bakteriozne plamenjače na glogu.

Opština Andrijevica. Na retko prisutnim pojedinačnim stablima dunje, jabuke i kruške, starosti više od 15 godina, u naseljima Slatina, Trešnjevo, Kralje, Prisoja i Zabrđe, bili su prisutni simptomi bakteriozne plamenjače, u vidu nekroze cvetova i lišća, u slabom intenzitetu (3—5%).

Opštine Plav i Rožaje. Pojedinačna stabla jabuke, starosti 20 i više godina, u naseljima Murino, Brezovice i Pepići, u opštini Plav, imala su simptome bakteriozne plamenjače, u manjoj meri izražene, praktično u vidu retkih zaraza na pojedinačnim cvetovima. U naselju Murino, u nekoliko zasada dunje sa ukupno oko 1500 sadnica u prvoj godini po sadnji, nisu uočeni simptomi bolesti. U naselju Grnčar, u opštini Plav, u zasadu kruške sa 500 stabala, starosti 3—4 godine, takođe nije bilo simptoma bakteriozne plamenjače. Na retko prisutnim starim stablima jabuke u naseljima u opštini Rožaje nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače.

Opština Nikšić. Na području ove opštine najjače zaraze bakterioznom plamenjačom uočene su na krušci, a manje na dunji i jabuci.

Obilaskom više zasada kruške i jabuke, u naseljima Liverovići (Župa Nikšićka), Gornje Polje, Mokra Njiva i Vidrovan, utvrđeno je prisustvo simptoma bakteriozne plamenjače. Najjača zaraza bila je u zasadu kruške sa 200 stabala, u naselju Liverovići, u blizini jezera, u zoni visoke vlažnosti, na nadmorskoj visini od oko 760 m. U ovom zasadu kruške, sa sortama Gijova, Crvena Viljamovka i jedne nepoznate sorte, starosti sedam godina, simptomi bolesti bili su izraženi prvenstveno u vidu plamenjače mladara i nekroze cvasti. Zaraze su bile prisutne i na mladim, tek formiranim plodićima, u vidu njihovog potpunog sušenja i propadanja (Sl. 25 i 26), kao i na starijim plodovima, u vidu nekroze crne boje na površini i u unutrašnjosti ploda. Intenzitet

zaraze u ovom zasadu ocenjen je sa 20—30%. U nekoliko zasada kruške, u naseljima Gornje Polje i Mokra Njiva, sa sortom Viljamovka, takođe su uočeni simptomi bakteriozne plamenjače, ispoljeni u vidu nekoliko osušenih grana, kao posledica zaraze iz prethodne vegetacije, kao i u vidu pucanja kore na deblu (Sl. 27 i 28).



Slike 25 i 26. Crna nekroza plodića i lišća kruške.



Slika 27. Osušena grana na stablu kruške. **Slika 28.** Pucanje kore na deblu kruške.

U zasadima jabuke, u naseljima Liverovići i Vidrovan, kao i na pojedinačnim stablima jabuke na okućnicama i starim stablima pored puteva, zaraza je bila u manjem stepenu, u vidu nekroze cvetova i lišća. Brojna pojedinačna stabla dunje, starosti više od 15 godina, koja su

prisutna u svim naseljima ove opštine, na okućnicama i pored puteva, imala su simptome bolesti uglavnom u vidu nekroze cvetova, u malom procentu.

Opštine Pljevlja, Plužine, Žabljak i Šavnik. Na retko prisutnim pojedinačnim stablima dunje, kruške i jabuke, nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače, osim na jednom stablu dunje, u naselju Đurđevića Tara (Pljevlja), u vidu nekroze cvetova.

Opštine Mojkovac i Kolašin. Obilaskom više zasada jabučastog voća, starosti preko 20 godina, u naseljima opštine Kolašin (Gornja Rovca, Osretci, Dragovića Polje i Liješnje), nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače. U novopodignutim zasadima jabuke (1400 sadnica), kruške (1000 sadnica) i dunje (1000 sadnica), starosti dve godine, u naselju Gornji Rovci, nisu bili prisutni simptomi bakteriozne plamenjače. Simptomi bolesti u vidu plamenjače mladara uočeni su na pojedinačnim starim stablima dunje, kruške i jabuke, na okućnicama, u gradskoj zoni Mojkovca.

Opština Cetinje. Nalazi se u planinskoj zoni zemlje, na nadmorskoj visini od oko 700 m i nema značajnih zasada jabučastih voćnih vrsta. Na retko prisutnim pojedinačnim stablima dunje, kruške i jabuke, nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače. U mladom zasadu dunje starosti dve godine, sa oko 200 stabala, u naselju Strugari, uočeni su simptomi na jednom stablu, u vidu jednog zaraženog mladara, sa karakterističnim, lučno povijenim vrhom i osušenim lišćem (Sl. 29 i 30).



Slike 29 i 30. Lučno povijen zaražen mladara na mladom stablu dunje.

Opštine Podgorica i Danilovgrad. Na području ovih opština pregledano je na desetine većih i manjih zasada kruške, jabuke i dunje, kao i brojna pojedinačna stabla ovih voćnih vrsta na okućnicama. Pregledane su i ukrasne i spontane vrste koje su domaćini bakterije *E. amylovora*:

vatreni trn (*Pyracantha* sp.), polegla dunjarica (*Cotoneaster* sp.) i dr., u parkovima, u gradskim zonama, kao i biljke gloga (*Crataegus* sp.) na neoobrađenim površinama, pored puteva. Ni na jednom od pomenutih domaćina nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače.

Opština Bar. Simptomi bakteriozne plamenjače uočeni su u jednom zasadu kruške, u naselju Mrkojevići, na nadmorskoj visini od oko 600 m, na brdu iznad gradske zone. U ovom zasadu starosti 5—6 godina, sa 100 stabala i četiri zastupljene sorte: Santa Marija (oko 70 stabala), Junska lepotica, Junsko zlato i Viljamovka, simptomi bakteriozne plamenjače su uočeni na svim sortama, u vidu plamenjače mladara („pastirski štap”), nekroze cvetova i plodića, kao i nekroze starijih grana (Sl. 31 i 32). Intenzitet zaraze je ocenjen sa 8—15%. U zasadu jabuke koji se nalazio neposredno pored zasada kruške, nije uočeno prisustvo simptoma.



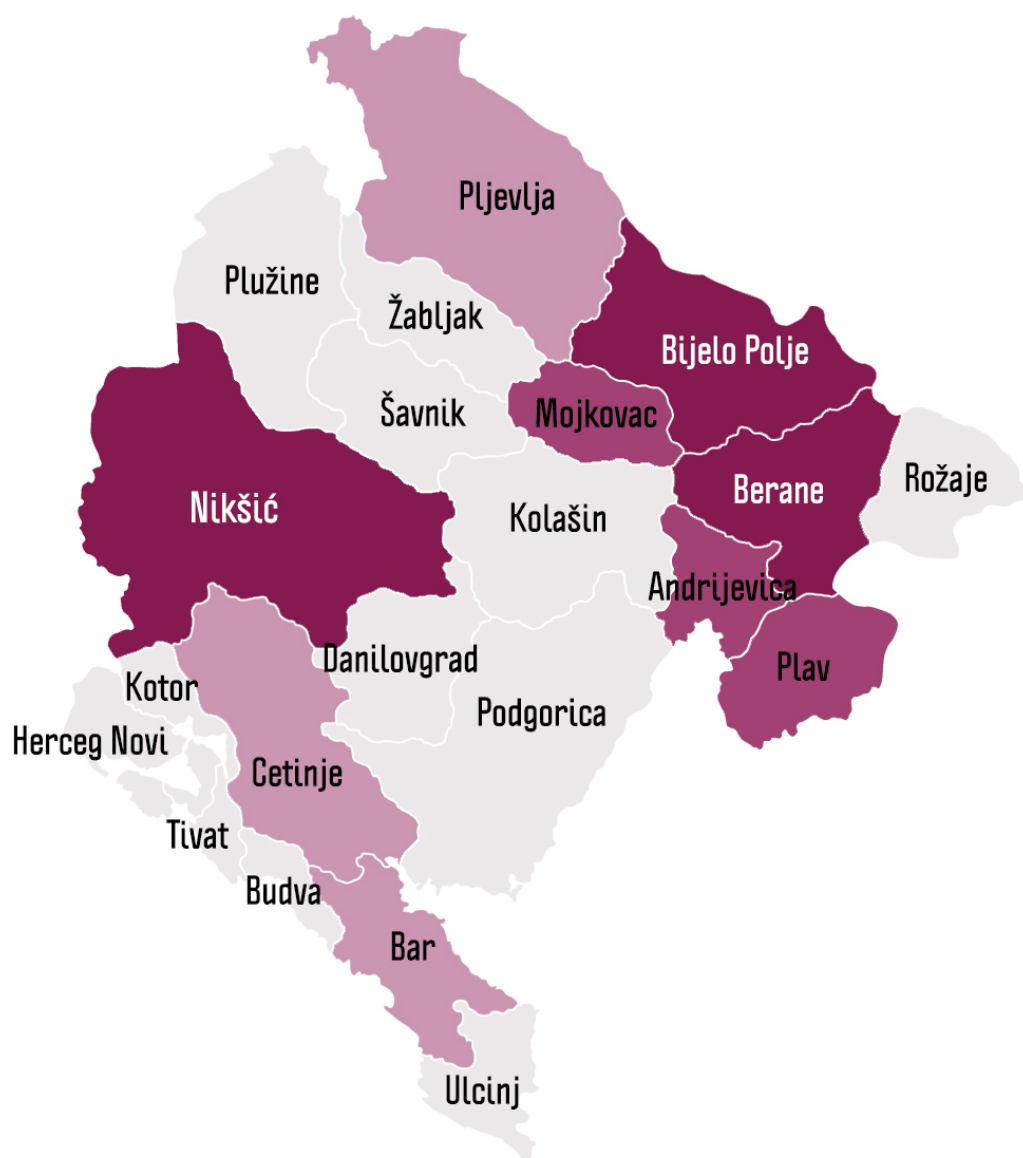
Slike 31 i 32. Simptomi bakteriozne plamenjače na grani, lišću i plodićima kruške.

Opština Ulcinj. U nekoliko zasada kruške, u naselju Selita, blizu ušća reke Bojane, u zaleđu mora, sa oko 500 stabala starosti 2—17 godina, sa sortama Junsko zlato, Junska lepotica, Santa Marija i Viljamovka, nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače.

Opštine Budva, Tivat, Kotor i Herceg Novi. Na ovom području gaje se uglavnom agrumi, a na pojedinačnim, retko prisutnim stablima dunje, kruške i jabuke, nisu uočeni simptomi bolesti.

Rezultati terenskih istraživanja pokazuju da su zasadi dunje, kruške i jabuke sa većim stepenom zaraze, kao i pojedinačna jako zaražena stabla ovih voćnih vrsta, u severoistočnom (opštine Bijelo Polje i Berane) i zapadnom delu zemlje (opština Nikšić), glavna žarišta bakterije iz kojih se ona širi na nova područja i nove biljke domaćine. Udaljavanjem od ovih regiona postoji tendencija smanjenja stepena zaraze, pa su regioni sa sporadičnom pojavom bakterije područja opština Mojkovac, Plav i Andrijevica. Pojedinačni izolovani slučajevi pojave bakterije uočeni su u opštinama Pljevlja, Cetinje i Bar.

Prisustvo bakterije nije utvrđeno u planinskim regionima u centralnom (opština Kolašin) i istočnom delu zemlje (opština Rožaje), zatim u centralnom, ravničarskom regionu (opštine Podgorica i Danilovgrad), u visoko–planinskim regionima na severozapadu zemlje (opštine Plužine, Žabljak i Šavnik) i u primorskim opštinama (Ulcinj, Budva, Tivat, Kotor i Herceg Novi) (**Grafikon 3**).



Grafikon 3. Prisustvo i rasprostranjenost *E. amylovora* u C.Gori (2012-2015.g.)

- najugroženiji regioni
- sporadična pojava bakterije
- pojedinačni izolovani slučajevi pojave bakterije
- regioni bez pojave bakterije

5.2. Domaćini bakterije, ocena štetnosti i simptomi

Prisustvo simptoma bakteriozne plamenjače utvrđeno je na četiri voćne vrste: dunja (*Cydonia oblonga*), kruška (*Pyrus communis*), jabuka (*Malus domestica*), mušmula (*Mespilus germanica*) i na jednoj vrsti iz spontane flore – glog (*Crataegus* sp.). Simptomi su uočeni nakon cvetanja i u fazi intenzivnog porasta mladara dunje, kruške, jabuke, mušmule i gloga, u periodu od kraja maja do sredine juna.

Najugroženija voćna vrsta je dunja, a najzastupljeniji tipovi simptoma su plamenjača cveta i plamenjača mladara, koji se manifestuju mrkom nekrozom. Prvi simptomi na ovoj voćnoj vrsti uočeni su neposredno nakon cvetanja, u vidu naglog sušenja cvetova, koji najpre postaju vodenasti, a zatim dobijaju mrku boju. Sa zaraženih cvetova infekcija se širila kroz cvetne drške na listove, u vidu postepene nekroze, prvo duž lisnih nerava, a zatim i po čitavoj površini lista. Obolelo lišće imalo je tamnu, mrku boju i visilo je na granama. Kasnije, tokom intenzivnog porasta mladara dunje, primećena je njihova nekroza i sušenje, od vrha ka osnovi. Dužina nekroze na mladima iznosila je najčešće 20–25 cm. Daljim razvojem bolesti vrhovi mladara su se lučno savijali u vidu „pastirskog štapa”, bez pojave bakterijskog eksudata. Ovakva zaražena stabla dunje bila su veoma lako uočljiva zbog prisustva velikog broja nekrotiranih cvetova u kruni i povijenih mladara sa lišćem, tamne, mrke boje. Intenzitet zaraze u krošnji dunje je najčešće iznosio oko 30–40%, a u nekim slučajevima je bio i znatno viši i kretao se i do 60% (**Sl. 33-38**).

Kod kruške je evidentirana nešto slabija zaraza (5–30%), uglavnom u vidu nekroze plodova i plamenjače mladara, crne boje. Često su u krošnji uočavani zaraženi, smežurani, tek formirani plodići crne boje. Simptomi bakteriozne plamenjače su bili prisutni i na većim plodovima, u vidu crne nekroze na jednom delu ili na čitavoj površini ploda. Ova nekroza zahvatala je i unutrašnje tkivo ploda. Zaraženi plodići i plodovi visili su na granama. Simptomi na mladima kruške bili su prisutni u vidu nekroze grančica i lišća, crne boje i sa karakterističnim savijanjem vrhova mladara u vidu „pastirskog štapa”. Čest simptom na krušci je bio pucanje kore i rak-rane na deblu i granama. Uklanjanjem epidermisa, ispod kore se jasno uočavala crvenkasto-mrka boja subkortikalnog tkiva. Vrlo često u krošnji ove voćne vrste bila je i po koja osušena starija grana, verovatno kao posledica zaraze u prethodnoj vegetaciji (**Sl. 39-45**).

Na jabuci bolest je imala sporadičan karakter (5–20%), uglavnom u vidu plamenjače mladara koja se širila od cveta, tako da su najčešće bili zaraženi samo vrhovi mladara sa lišćem. Uočene su i zaraze na mladim plodovima, u vidu mrke nekroze na površini i u unutrašnjosti ploda (**Sl. 46-51**).

Ocena intenziteta zaraze dunje, kruške i jabuke prikazana je tabelarno, po godinama, za svaku opštinu (**Tab. 12-14**).

Tabela 12. Ocena inteziteta zaraze dunje, kruške i jabuke, u 2012. godini
(van der Zwet and Keil, 1979).

Opština	Dunja		Kruška		Jabuka	
	% zaraženosti	ocena	% zaraženosti	ocena	% zaraženosti	ocena
Bijelo Polje	25–60	6–4	5–10	8–7	5–15	8–6
Berane	20–45	6–5	12–15	7–6	10–15	7–6
Nikšić	20–25	6	15–25	6	10–15	7–6
Bar	/	/	8–10	7	/	/
Mojkovac	5–8	8–7	5	8	5	8
Andrijevica	5	8	3–5	9–8	3	9

Tabela 13. Ocena inteziteta zaraze dunje, kruške i jabuke, u 2013. godini.

Opština	Dunja		Kruška		Jabuka	
	% zaraženosti	ocena	% zaraženosti	ocena	% zaraženosti	ocena
Bijelo Polje	30–60	5–4	10–15	7–6	10–15	7–6
Berane	25–50	6–5	15–20	6	10–20	7–6
Nikšić	15–25	6	20–30	6–5	10–15	7–6
Bar	/	/	10–15	7–6	/	/
Mojkovac	5	8	5–8	8–7	5–8	8–7
Andrijevica	5	8	5	8	5	8

Tabela 14. Ocena inteziteta zaraze dunje, kruške i jabuke, u 2014. godini.

Opština	Dunja		Kruška		Jabuka	
	% zaraženosti	ocena	% zaraženosti	ocena	% zaraženosti	ocena
Bijelo Polje	25–55	6–4	8–10	7	5–15	8–6
Berane	25–40	6–5	10–15	7–6	10–15	7–6
Nikšić	15–25	6	15–25	6	10–12	7
Bar	/	/	10–12	7	/	/
Mojkovac	5	8	5	8	5	8
Andrijevica	5	8	/	9–8	3	9

Kako se vidi iz tabela 12–14, najjači intenzitet zaraze tokom sve tri godine istraživanja bio je na dunji i to u opštinama Bijelo Polje (25–60%, sa ocenom 6–4) i Berane (20–50%, sa ocenom 6–5), dok je nešto slabiji bio u opštini Nikšić (15–25%, ocena 6). Kruška je imala najjači intenzitet zaraze u opštini Nikšić (15–30%, sa ocenom 6–5), a slabiji u opštinama Berane (10–20%, ocena 7–6), Bijelo Polje (5–15%, ocena 8–6) i Bar (8–15%, ocena 7–6). Kod jabuke je u opštinama Bijelo Polje, Berane i Nikšić utvrđen približno isti intenzitet zaraze, koji se kretao u intervalu od 5–20%, sa ocenom 8–6. Najslabiji intenzitet zaraze koji nije prelazio 8%, sa ocenom 7, utvrđen je na dunji, krušci i jabuci, u opštinama Mojkovac i Andrijevica, tokom sve tri istraživačke godine.

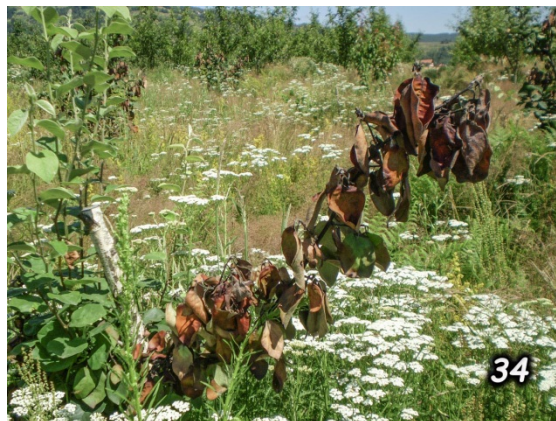
Simptomi bakteriozne plamenjače na mušmuli manifestovali su se u vidu nekroze cvasti i listova, obično na vrhovima mladara, u malom procentu (3–5%) na pojedinačnim biljkama, na okućnicama (**Sl. 52-54**).

Na glogu simptomi su bili prisutni u vidu plamenjače cvasti i mladara, tamne, gotovo crne boje. Obolelo lišće imalo je tamnu boju i visilo je sa mladara. Na zaraženim jednogodišnjim mladrima uočena je nekroza i lučno savijeni vrhovi u vidu „pastirskog štapa” (**Sl. 55-57**). Uklanjanjem epidermisa jasno se videla mrka nekroza sprovodnih sudova. Prisustvo simptoma bakteriozne plamenjače na biljkama gloga koje su pronađene uglavnom pored puteva, na neobrađenim zemljištima, ali često u blizini voćnjaka, ukazuje na činjenicu da ova vrsta iz spontane flore predstavlja značajan izvor inokuluma za prenošenje bakterije na jabučaste voćne vrste.

Prisustvo simptoma u vidu plamenjače mladara utvrđeno je i na vrstama divlje kruške i jabuke, kao i na usamljenim starim stablima dunje, jabuke i kruške, na međama i utrinama, najčešće u blizini zasada jabučastog voća (100–300 m), ali i na većoj udaljenosti.

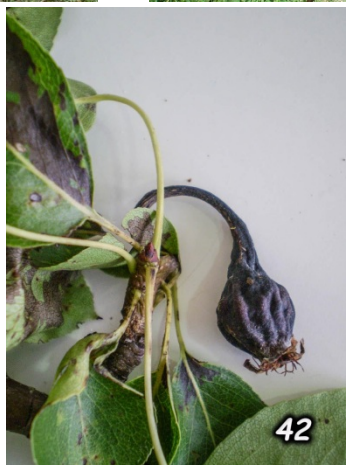
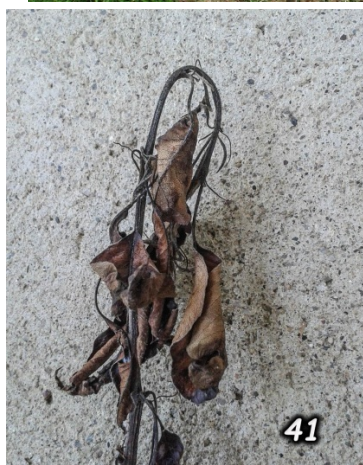
Na ukrasnim vrstama: polegloj dunjarici (*Coteoneaster* sp.) i vatrenom trnu (*Pyracantha* sp.), na uređenim površinama, u gradskim zonama, nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače.

Prilikom obilaska terena, sa zaraženih biljaka prikupljeno je više od 200 biljnih uzoraka sa simptomima karakterističnim za bakterioznu plamenjaču. Zabeležen je lokalitet i datum prikupljanja uzoraka, kao i biljka domaćin i sorta. Izvršena je klasifikacija uzoraka po tipu simptoma: palež cvetova (cvasti), nekroza plodića i plodova, palež listova, plamenjača mladara, kao i delovi subkortikalnog tkiva grana sa karakterističnom crveno–mrkom bojom.



Slike 33-38. Simptomi bakteriozne plamenjače na dunji:

Sl. 33. Zaraženo mlado stablo dunje; Sl. 34. Tamna nekroza mladara; Sl. 35. Nekroza lišća i cvetova; Sl. 36. Početni simptomi u vidu sušenja cveta i listova; Sl. 37. Crna nekroza duž lisnih nerava i na vrhu plodića; Sl. 38. Nekrotiran cvet i cvetna drška sa prisustvom bakterijske sluzi.



Slike 39-45. Simptomi bakteriozne plamenjače na krušci:

Sl. 39. Jaka zaraza mladog stabla kruške; Sl. 40. Osušeni mladari sa lišćem; Sl. 41. Lučno savijen nekrotiran mladar; Sl. 42. Smežuran plodić crne boje; Sl. 43. Tamna nekroza na starijem plodu; Sl. 44. Ispucala kora grane; Sl. 45. Mrko-crvena obojenost tkiva sa jasno uočljivim prelazom između zdravog i obolelog dela grane.



Slike 46-51. Simptomi bakteriozne plamenjače na jabuci:

Sl. 46. Plamenjača mladara sa karakterističnim lučno savijenim vrhom; Sl. 47. Osušena starija grana; Sl. 48. Mrka nekroza na plodu i lišću; Sl. 49. Nekroza grane i pupoljka sa karakterističnom mrko-crvenom bojom; Sl. 50. Jaka infekcija cvetova i tek formiranih plodića; Sl. 51. Nekroza mladog ploda.



Slike 52-54. Simptomi bakteriozne plamenjače na mušmuli:

Sl. 52. Mrka nekroza lišća; Sl. 53. Zaraženo lišće i plodići; Sl. 54. Crna nekroza ploda.

Slike 55-57. Simptomi bakteriozne plamenjače na glogu:

Sl. 55. Nekroza plodića; Sl. 56. Lučno savijen vrh zaražene grančice; Sl. 57. Tamna nekroza cvasti i lišća.

5.3. Praćenje uticaja meteoroloških faktora na pojavu bolesti

Utvrđena je tesna međusobna povezanost između meteoroloških faktora i uslova pogodnih za infekciju, odnosno, pojavu simptoma bakterijske plamenjače, u različitim klimatskim regionima Crne Gore.

Podaci iz 2012. godine:

Ova godina odlikovala se izuzetno kišnim i hladnim prolećnim periodom, što je uslovilo i kasnije kretanje vegetacije kod jabučastih voćnih vrsta, kao i produženu fenofazu cvetanja. Najjači intenzitet zaraze bakterijskom plamenjačom utvrđen je na dunji, dok su na jabuci i krušci zabeležene sporadične zaraze manjeg intenziteta.

Lokaliteti Bijelo Polje i Nikšić. Praćenjem fenofaza na ovim lokalitetima, utvrđeno je da je dunja cvetala u periodu od 8. do 23. maja, sa punim cvetanjem oko 16. maja. Praćenjem meteoroloških faktora sa stanice (**Sl. 58**), uočeno je da su u ovom periodu bila čak 4 kišna perioda (8—9. 5, 13—14. 5, 16—17. 5 i od 21. 5. do 4. 6.), što znači da je tokom čitavog perioda cvetanja dunje bilo padavina. Vlažnost vazduha se kretala u proseku 56—79% (u kišnim danima i do 99%), a srednje dnevne temperature su bile u opsegu od 7—18 °C. Interesantno je zapažanje da su u periodu od 8. do 12. maja, a zatim i od 19. do 21. maja, zabeležene izuzetno visoke dnevne temperature vazduha koje su se kretale od 21 do 28 °C, što je omogućilo razvoj bakterije i infekciju. Prvi simptomi bakterijske plamenjače na dunji uočeni su oko 12. juna, u vidu nekroze i sušenja cvetova.

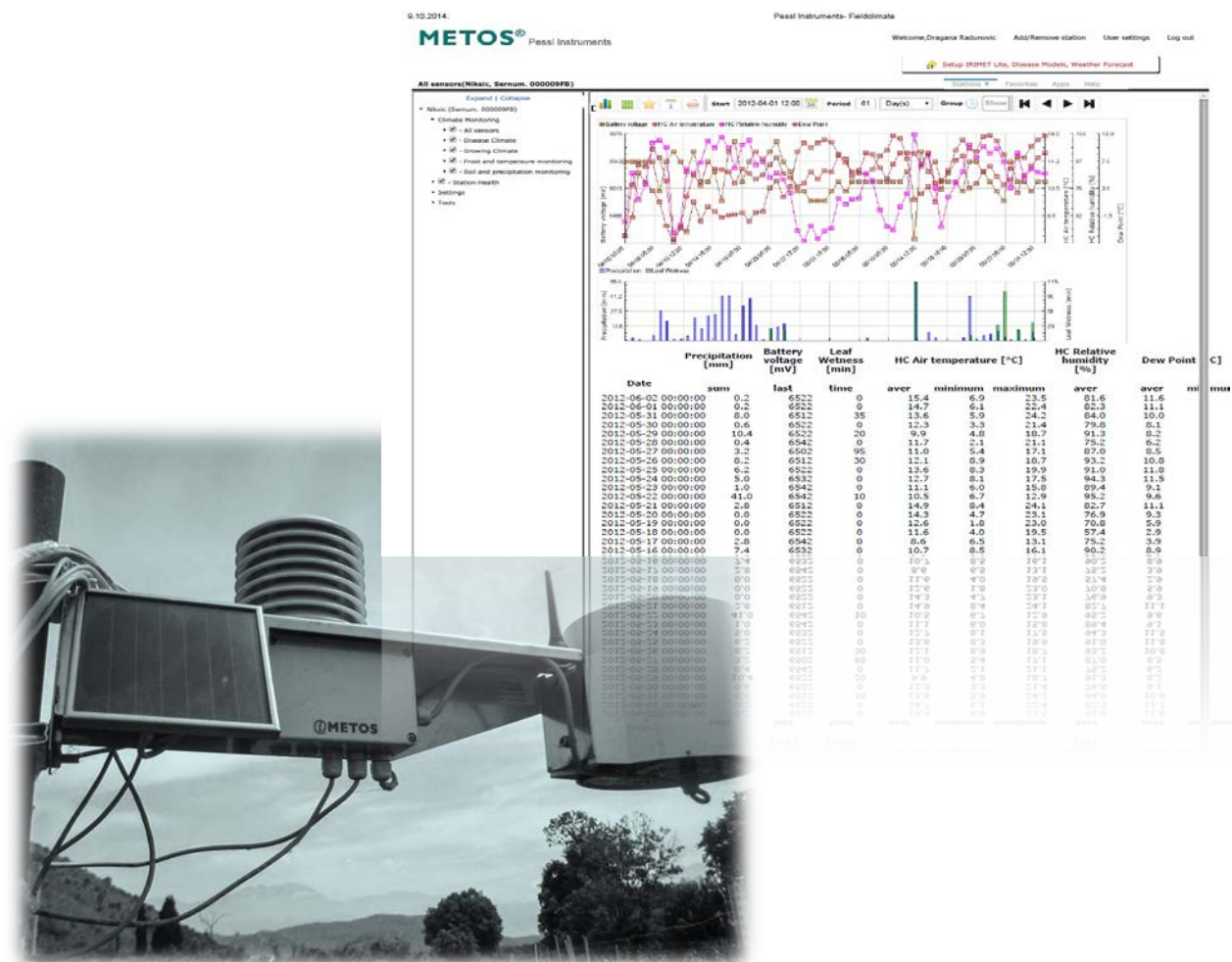
Jabuka i kruška na ovim lokalitetima cvetale su u periodu od 28. aprila do 12. maja, sa punim cvetanjem oko 5. maja. U ovom periodu srednja dnevna temperatura vazduha kretala se u intervalu 12—17 °C, dok su noćne temperature tokom nekoliko dana bile niže od 10 °C, što je ispod praga za razvoj *E. amylovora*. Vlažnost vazduha bila je u opsegu 55—79%, sa veoma malo padavina (2,4 l/m²), tek pred kraj posmatranog perioda (7—9. maj), kada su ove voćne vrste već završavale cvetanje. Najverovatnije je da su nepovoljni meteorološki faktori za razvoj bakterije u posmatranom periodu, rezultirali slabim infekcijama na ovim voćnim vrstama, koje su se manifestovale u vidu sporadičnih nekroza pojedinačnih mladara.

Lokalitet Podgorica. U centralnom, nizijskom delu zemlje, na lokalitetu Podgorica, dunja je cvetala u periodu od 19. aprila do 5. maja, sa punim cvetanjem oko 27. aprila.

Prema podacima sa stanice, tokom posmatranog perioda, na lokalitetu Podgorica palo je oko 100 l/m² kiše. Vlažnost vazduha se kretala u intervalu 71—95%. Temperature su bile 7—12 °C, sa noćnim temperaturama koje su se spuštale i ispod 6 °C.

Navedeni parametri ukazuju da su na ovom lokalitetu, bez obzira na kišni period sa dovoljno vlage, temperature ispod donje granice optimalnih tokom čitavog perioda cvetanja dunje, onemogućile infekciju cvetova.

Jabuka i kruška su cvetale u periodu od 5. do 21. aprila, sa punim cvetanjem oko 13. aprila. Tokom perioda cvetanja jabuke i kruške, srednje dnevne temperature su se kretale u intervalu 9–12 °C, što je daleko niže od donje granice potrebne za razvoj bakterije.



Slika 58. a) Meteorološka stanica (Metos)

b) Grafički i tabelarni prikaz podataka o meteorološkim faktorima

Lokalitet Bar. Na ovom lokalitetu u južnom, primorskom delu zemlje, dunja je cvetala u periodu od 16. do 30. aprila, sa punim cvetanjem oko 23. aprila. Srednje dnevne temperature

vazduha tokom posmatranog perioda kretale su se u opsegu 12—17°C. Vlažnost vazduha iznosila je 60—70%, sa dva kišna perioda (16—18. 4. i 20—22. 4.).

Jabuka i kruška su cvetale u periodu od 10. do 24. aprila, sa punim cvetanjem oko 17. aprila, kada su se srednje dnevne temperature kretale u granicama 9—16 °C, što je ispod donje granice optimuma za razvoj bakterije. Tokom čitavog perioda bilo je padavina, ukupno je palo oko 200 l/m² kiše, a vlažnost vazduha je iznosila 50—80%.

Temperature tokom čitavog perioda cvetanja dunje, jabuke i kruške, bile su ispod praga za razvoj bakterije i infekciju.

Podaci iz 2013. godine:

Ova godina odlikovala se jačom pojavom simptoma bakteriozne plamenjače na krušci, u odnosu na prethodnu godinu. Na dunji su zabeležene najjače zaraze i najizraženiji simptomi, dok su simptomi na jabuci imali sporadičan karakter.

Lokaliteti Bijelo Polje i Nikšić. Dunja je na ovim lokalitetima cvetala u periodu od 2. do 15. maja, sa punim cvetanjem oko 9. maja. Tokom posmatranog perioda cvetanja dunje, vlažnost vazduha je bila konstantno iznad 75% (u nekim danima čak i do 99%). Takođe, bilo je više kišnih perioda: 1—7. 5., zatim 9—14. 5., što znači da je tokom čitavog perioda cvetanja dunje bilo padavina. Srednje dnevne temperature vazduha su bile u proseku između 17 °C i 18 °C, a tokom četiri dana, upravo u periodu punog cvetanja dunje, dostizale su i 21 °C, što je u okviru optimuma za ostvarivanje infekcija.

Povoljni meteorološki parametri tokom cvetanja dunje: visoka relativna vlažnost (iznad 70%), više dužih kišnih perioda i temperature u okviru optimalnih (21 °C), omogućili su masovne infekcije cvetova. Prvi simptomi bakteriozne plamenjače na ovim lokalitetima pojavili su se na cvetovima dunje već krajem maja, odnosno, uočeni su već 28. maja, u vidu nekroze, tj. sušenja cvetova.

Jabuka i kruška imale su fazu cvetanja u periodu od 23. aprila do 5. maja, sa punim cvetanjem oko 28. aprila. U ovom periodu, srednja dnevna temperatura vazduha kretala se u intervalu 12—19 °C, sa temperaturom od 19 °C upravo u danima punog cvetanja jabuke i kruške. Kišni period nastupio je u periodu 1—7. maja. Temperature u okviru donje granice optimalnih za razvoj *E. amylovora* i kratki kišni period u vreme kada je još bilo otvorenih cvetova, omogućili su ostvarivanje infekcije na ovim voćnim vrstama, što je rezultiralo pojavom simptoma u većem intenzitetu nego u prethodnoj vegetaciji.

Lokalitet Podgorica. Na ovom lokalitetu dunja je cvetala u periodu 14—26. aprila, sa punim cvetanjem oko 20. aprila.

Prema podacima sa stanice, tokom čitavog posmatranog perioda na lokalitetu Podgorice nije bilo padavina. Padavine su bile samo jedan dan (23. 4.). Vlažnost vazduha tokom cvetanja dunje nije prelazila 40%, više dana je bila čak i ispod 30%, sa izuzetkom dva dana (23. i 24. 4.) kada se kretala oko 70%, a dunja je već precvetavala. Temperature su bile 17–18 °C, a pri kraju posmatranog perioda (24. i 25. 4.), kada je dunja već precvetala, su dostigle 21 °C.

Temperature ispod donje granice optimalnih, odsustvo tj. potpuni izostanak padavina i vlažnost vazduha konstantno ispod 40%, onemogućili su infekciju cvetova dunje na ovom lokalitetu. Optimalne temperature za infekciju bile su tek pri kraju posmatranog perioda, kada je dunja već završila cvetanje, što je uz ostale nepovoljne faktore, bio razlog da do infekcije i ne dođe.

Jabuka i kruška su na ovom lokalitetu cvetale u periodu od 31. marta do 12. aprila, sa punim cvetanjem oko 6. aprila. Tokom perioda cvetanja jabuke i kruške, srednje dnevne temperature su iznosile 12–15 °C, što je daleko niže od donje granice potrebne za razvoj bakterije.

Lokalitet Bar. Na ovom lokalitetu dunja je cvetala u periodu 11–23. aprila, sa punim cvetanjem oko 17. aprila. Srednje dnevne temperature vazduha tokom čitavog posmatranog perioda bile su ispod optimalnih za ostvarivanje infekcije i kretale su se između 15 °C i 17 °C, vlažnost vazduha je bila ispod 70% i kretala se između 50% i 70%, padavina nije bilo, osim 22. i 23. 4., kada je dunja već precvetala. Ovi parametri ukazuju na nepovoljne meteorološke uslove za ostvarivanje infekcije tokom fenofaze cvetanja dunje.

Jabuka i kruška su cvetale u periodu od 7. do 20. aprila, sa punim cvetanjem oko 14. aprila, kada su se srednje dnevne temperature kretale u granicama od 12 do 16 °C, što je ispod donje granice optimuma za razvoj bakterije. Tokom čitavog perioda cvetanja nije bilo padavina, osim jednog dana (10. 4.), kada je palo svega 4 l/m². Relativna vlažnost vazduha tokom čitavog perioda cvetanja jabuke i kruške iznosila je 30–40% (osim 70% zabeleženih 10. aprila), što je daleko ispod potrebne vlažnosti za ostvarenje infekcije.

Podaci iz 2014. godine:

U ovoj godini najjače zaraze ostvarene su na dunji, a na jabuci i krušci su zabeležene manje sporadične zaraze.

Lokaliteti Bijelo Polje i Nikšić. Na ovim lokalitetima dunja je cvetala u vremenu od 23. aprila do 7. maja, sa punim cvetanjem oko 1. maja. Vlažnost vazduha je tokom čitavog perioda bila konstantno iznad 95%. Duži kišni period zabeležen je od 23. 4. do 2. 5, kada je palo oko 70 l/m² kiše. Srednje dnevne temperature kretale su se u intervalu 14–18 °C, a 3 dana (2–4. 5.), upravo u vreme punog cvetanja dunje, bile su i preko 19 °C. Povoljni meteorološki faktori

(dovoljno vlage i optimalne temperature) omogućili su da bakterija *E. amylovora* ostvari infekciju cvetova dunje. Prvi simptomi bakteriozne plamenjače na dunji uočeni su na ovim lokalitetima već 23–25. maja, u vidu naglog sušenja cvetova.

Jabuka i kruška cvetale su u periodu od 13. do 27. aprila, sa punim cvetanjem oko 20. aprila. Kiša je padala tokom čitavog posmatranog perioda (sa izuzetkom dva dana, 17. i 18. 4) i palo je ukupno oko 60 l/m² padavina. Vlažnost vazduha je bila u intervalu 70–85%, a u nekoliko kišnih dana i preko 90%. U ovom periodu zabeležene su veoma niske srednje dnevne temperature koje su se kretale u intervalu od 5–14 °C, sa noćnim temperaturama ispod 2 °C. Možemo uočiti da su u periodu cvetanja jabuke i kruške, niske temperature bile limitirajuće za razvoj bakterije.

Lokalitet Podgorica. Period cvetanja dunje bio je od 5. do 16. aprila, sa punim cvetanjem oko 10. aprila. Posmatranjem meteoroloških faktora sa stanice utvrđeno je da se vlažnost vazduha kretala u intervalu 40–50%, pa čak i ispod 40% (vlažnost vazduha od 34% zabeležena je upravo 10. aprila). Tokom čitavog perioda cvetanja dunje nije bilo kiše, osim 16. aprila kada je palo oko 50 l/m², a tada je dunja već završila cvetanje. Srednje dnevne temperature vazduha iznosile su 13–18 °C, s tim što su ove najniže temperature zabeležene upravo u periodu od 9. do 13. aprila, tokom punog cvetanja dunje.

Kod jabuke i kruške period cvetanja trajao je od 23. marta do 4. aprila, sa punim cvetanjem oko 28. aprila. Ovaj period obeležile su srednje dnevne temperature koje nisu prelazile 15 °C, što je značajno ispod donje granice optimalne za razvoj *E. amylovora*. Vlažnost vazduha je bila konstantno u intervalu 50–60%, a padavine su potpuno izostale.

Vidimo da na lokalitetu Podgorice ni uslovi vlage, a ni temperaturni uslovi, nisu omogućili da se infekcija ostvari. Izrazito suvi period, bez padavina i niska relativna vlažnost vazduha, sa temperaturama nižim od 18 °C, nisu pogodovali razvoju *E. amylovora*.

Lokalitet Bar. Dunja je na ovom lokalitetu cvetala u periodu od 3. do 14. aprila, sa punim cvetanjem oko 8. aprila. Srednje dnevne temperature vazduha kretale su se u intervalu 12–16 °C. Tokom čitavog perioda cvetanja nije bilo padavina, osim dva dana (5. 4. i 10. 4.) kada je palo ukupno samo 7 l/m² kiše. Vlažnost vazduha bila je u intervalu 50–70%.

Jabuka i kruška cvetale su u vremenu od 28. marta - 8. aprila, kada su srednje dnevne temperature bile u opsegu 11–16 °C, vlažnost vazduha 60–70%, uz potpuni izostanak padavina, sa izuzetkom jednog dana (5. april), kada je palo svega 5,7 l/m² kiše.

Navedeni podaci ukazuju da ni uslovi vlage, a ni temperaturni uslovi, u posmatranom periodu, na ovom lokalitetu, nisu pogodovali razvoju *E. amylovora*.

5.4. Izolacija bakterije

Laboratorijskom obradom prikupljenih biljnih uzoraka, uspešno je izvršena izolacija bakterije na hranljivu podlogu sa saharozom (NSA). Dobijen je veći broj izolata, od kojih je 60 izolata, poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta, odabrano za dalje proučavanje.

5.5. Test patogenosti

5.5.1. Inokulacija plodova kruške i šljive

U testu patogenosti, na zelenim plodovima kruške sorte Viljamovka, dva dana nakon inokulacije, kod svih proučavanih izolata došlo je do pojave tamnozelenih, vlažnih pega na mestima uboda. Pojava sitnih beličastih kapljica bakterijskog eksudata u okviru pega uočena je trećeg i četvrtog dana od inokulacije. Petog i šestog dana od inokulacije tamnomrke pege su se proširile i spojile, uz pojavu mnoštva kapljica bakterijskog eksudata boje ćilibara. Sedmog i osmog dana od inokulacije trulež je zahvatila veći deo ploda i došlo je do razmekšavanja tkiva ploda (**Sl. 59-65**). Kod manjeg broja ispitivanih izolata razvoj simptoma na plodu je bio malo sporiji, tako da je pojava tamnih pega uočena tek četvrtog dana od inokulacije, a pojava kapljica bakterijskog eksudata sedam do osam dana nakon inokulacije.

Na zelenim plodovima šljive sorte Stenlej, drugog i trećeg dana od inokulacije došlo je do pojave mrkih ulegnutih pega sa sitnim kapljicama bakterijskog eksudata, koje su izbijale po čitavoj površini ploda. Pege su se širile, da bi petog i šestog dana od inokulacije zahvatile veći deo ploda čije je tkivo postalo razmekšano i počelo da truli (**Sl. 66-68**). Na zelenim plodovima jabuke takođe je uočena mrka nekroza sa kapljicama bakterijskog eksudata, četiri dana nakon inokulacije (**Sl. 69**).

Svi ispitivani izolati bakterije prouzrokovali su opisane simptome.

Kod plodova kruške i šljive inokulisanih sterilnom destilovanom vodom nisu uočene nikakve promene (**Sl. 64**).

5.5.2. Hipersenzitivna reakcija

Svi proučavani izolati prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju na listovima duvana (**Sl. 70**) i muškatle, u vidu nekroze, 24 h nakon inokulacije. Kod inokulacije sterilnom destilovanom vodom nisu uočene promene na lišću duvana i muškatle.



Slike 59-65. Test patogenosti na zelenim plodovima kruške:

Sl. 59. Tamnozeleni vlažna pega na mestu uboda, drugog dana od inokulacije; Sl. 60. Pojava kapljica bakterijskog eksudata, trećeg dana od inokulacije; Sl. 61. Nekroza na mestima uboda, četvrtog dana nakon inokulacije; Sl. 62. Širenje nekroze i bakterijski eksudat, pet dana nakon inokulacije; Sl. 63. Potpuna nekroza ploda, sedam dana nakon inokulacije; Sl. 64. Levo – negativna kontrola (voda), desno – crna nekroza sa bakterijskim eksudatom kod izolata *E. amylovora*; Sl. 65. Jasno uočljive kapi bakterijskog eksudata na smežuranom pocrnalom plodu.



Slike 66-68. Test patogenosti na zelenim plodovima šljive:

Sl. 66. Levo – vlažne pege na mestima uboda, dan nakon inokulacije, desno – negativna kontrola; Sl. 67. Pojava ulegnutih tamnih pega na mestima uboda, drugog dana od inokulacije; Sl. 68. Nekroza sa mnoštvom kapljica bakterijskog eksudata, trećeg dana nakon inokulacije.



Slika 69. Mrka nekroza i kapljice bakterijskog eksudata na zelenom plodu jabuke, 4 dana nakon inokulacije.

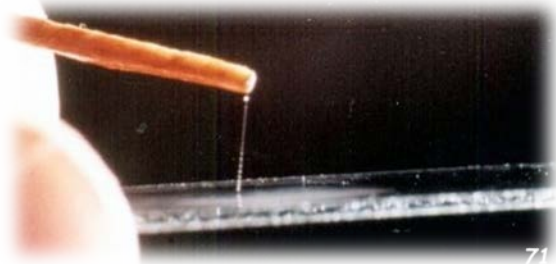


Slika 70. Hipersenzitivna reakcija na listu duvana 24 h nakon inokulacije.

5.6. Morfološke odlike proučavanih izolata

Posmatranjem oblika ćelija *E. amylovora* pomoću svetlosnog mikroskopa, uočeno je da su to kratki štapići, zaobljenih krajeva, najčešće pojedinačni, a ređe u paru.

Svi ispitivani izolati su gram–negativni jer su u reakciji sa 3% KOH, podizanjem bakterijske kolonije sa mikroskopske pločice čačalicom, formirali „končić” u vidu sluzaste niti (**Sl. 71**). Kod pozitivne kontrole *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* nije došlo do obrazovanja „končića”.



Slika 71. Formiranje končića kod *E. amylovora*.

5.7. Odgajivačke odlike proučavanih izolata

Na MPA podlozi proučavane bakterijske kolonije su sitne, prečnika 2 mm, okrugle, blago ispupčene i beličaste. Na podlozi sa kvašćevim ekstraktom, glukozom i kalcijum karbonatom (YDC), kolonije su bele boje, blago ispupčene, prečnika 2 mm, sjajne i sluzaste.

Na NSA podlozi, nakon tri dana razvoja, kod svih proučavanih izolata formirale su se izrazito ispupčene, beličaste, sjajne kolonije, sluzastog izgleda, prečnika 3–4 mm i ravnih ivica („levan” tip) (**Sl. 72**). Narednih dana razvoja kolonije su postale izrazito sluzaste i spojile su se

preko cele površine podloge. Stvaranje levana na NSA podlozi jedna je od važnih karakteristika *E. amylovora* (**Sl. 73 i 74**).



Slika 72. „Levan” tip kolonija *E. amylovora* na NSA podlozi.

Na King B podlozi svi proučavani izolati formirali su sitne, bele, okrugle kolonije, bez pojave fluorescencije (**Sl. 75 i 76**), što je takođe jedna od značajnih odlika *E. amylovora*, po kojoj se ova bakterija razlikuje od kontrolnog soja *Pseudomonas syringae* koji fluorescira na istoj podlozi (**Sl. 77**).

Na selektivnoj CCT podlozi kolonije su svetlo plave, providne, glatke i mukoidne, prečnika 4–7 mm, sporijeg porasta nego na King B. Na Cross–Goodman–ovoj podlozi nakon pet dana razvoja kolonije su svetle, sjajne, ispučene, prečnika 3–4 mm, sa karakterističnim „kraterastim“ udubljenjima na površini (**Sl. 78**).

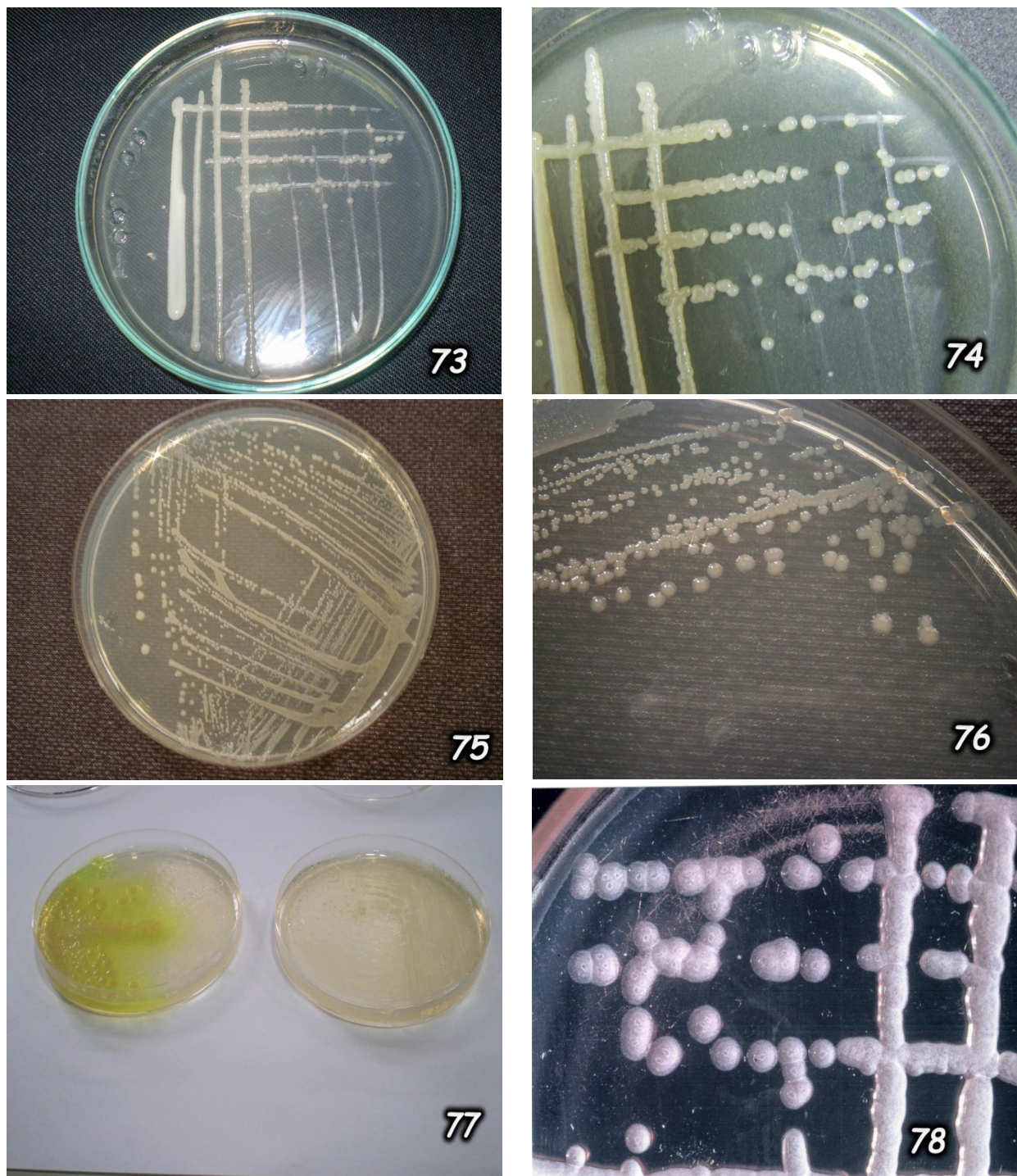
Utvrđeno je da se svi proučavani izolati razvijaju u tečnoj podlozi sa 5% , dok je u podlozi sa 7% NaCl kod četiri izolata (EaM 1, EaM 2, EaM 3 i EaM 4) razvoj bio veoma slab, a kod svih ostalih izolata nije bilo razvoja. Bakterija se razvijala pri temperaturi od 34 °C, ali ne i pri 36 °C.

5.8. Biohemijsko–fiziološke odlike proučavanih izolata

Na osnovu rezultata biohemijsko–fizioloških testova uočeno je da su svi proučavani izolati ispoljili uniformnost, odnosno homogenost u pogledu ispitivanih karakteristika (**Sl. 79-84**).

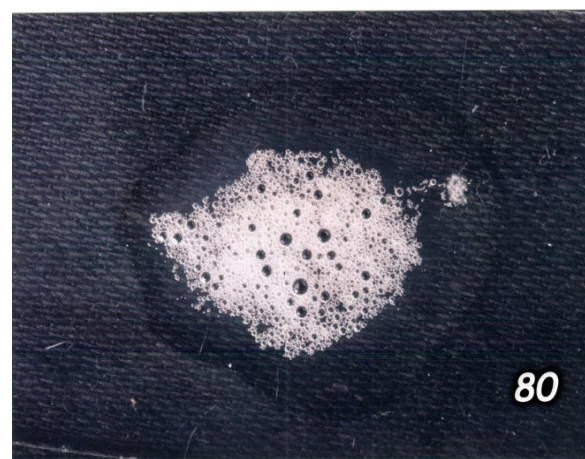
Rezultati ovih testova pokazuju da svi proučavani izolati stvaraju katalazu, ali ne i oksidazu. U pogledu korišćenja ugljenih hidrata svi izolati glukozu razlažu i u aerobnim i u anaerobnim uslovima, stvaraju levan na mesopeptonskoj podlozi sa saharozom, hidrolizuju želatin, ali ne i skrob, eskulin i Tween 80. U pogledu korišćenja azotnih jedinjenja ne stvaraju amonijak i ne redukuju nitrate. Svi proučavani izolati pokazuju osetljivost prema streptomycinu i hloramfenikolu.

Pri ovim testovima se identično ponašaju i kontrolni sojevi *E. amylovora* pod šiframa Ea–208, BUT 3/1, NCPPB 595 i CFBP 1430.



Slike 73-78. Odgajivačke odlike proučavanih izolata *E. amylovora*:

Sl. 73 i 74. „Levan” tip kolonija na NSA podlozi; Sl. 75 i 76. Izgled kolonija na King B podlozi; Sl. 77. Levo – pojava fluorescencije kod *P. syringae*, desno – odsustvo fluorescencije kod izolata *E. amylovora*, na King B podlozi; Sl. 78. Kolonije sa „kraterastim” udubljenjima na CG podlozi.



Slike 79-84. Biohemijske odlike proučavanih izolata *E. amylovora*:

Sl. 79. Negativna oksidaza – levo izolat *E. amylovora*, desno pozitivna kontrola; Sl. 80. Pojava mehurića kao znak aktivnosti katalaze; Sl. 81. Redukcija nitrata – levo mrka boja kod pozitivne kontrole, desno izolat *E. amylovora*; Sl. 82. Osetljivost na streptomycin – pojava zone inhibicije; Sl. 83. OF test (anaerobni uslovi) – levo negativna kontrola, desno pojava žute boje u podlozi kod izolata *E. amylovora*; Sl. 84. OF test (aerobni uslovi) – levo pojava žute boje u podlozi kod izolata *E. amylovora*, desno negativna kontrola.

5.9. Serološke odlike proučavanih sojeva

Na osnovu ispitanih seroloških karakteristika u ELISA i IF testu, dokazano je da svi proučavani sojevi pripadaju vrsti *E. amylovora*.

5.9.1. ELISA test

Primenom serološke metode PTA ELISA na mikrotitarskoj pločici, utvrđeno je da svi ispitivani sojevi reaguju sa specifičnim antitelima i poseduju iste serološke osobine kao bakterija *E. amylovora*.

Tokom izvođenja ovog testa, u više koraka inkubacije praćeno je vezivanje specifičnih antitela sa antigenima. Pipetiranjem bakterijskih uzoraka u bunarčiće mikrotitarske pločice u prvom koraku inkubacije, omogućeno je vezivanje bakterijskih antigena za zidove pločica. Nakon inkubacije i ispiranja, dodavanjem specifičnih antitela (IgG) omogućeno je stvaranje kompleksa antigen–antitelo. U sledećem koraku, izvršeno je dodavanje antitela konjugovanih enzimom alkalna fosfataza i njihovo vezivanje. U poslednjem koraku inkubacije, dodavanjem supstrata p–nitrofenil–fosfat–a (pNPP), obezbeđeno je odvijanje enzimske reakcije, u kojoj je nastao slobodni nitrofenol žute boje.

Vizuelnim očitavanjem rezultata na pločici uočena je promena boje u žutu kod svih ispitivanih sojeva i kod kontrolnog soja *E. amylovora* NCPPB 595, kao znak pozitivne reakcije (Sl. 85).



Slika 85. Žuta boja u bunarčićima kao znak pozitivne reakcije u ELISA testu.

Pri očitavanju rezultata na automatskom čitaču (spektrofotometru), pri talasnoj dužini od 405 nm, svi proučavani sojevi, kao i kontrolni soj, pokazali su pozitivnu reakciju, odnosno, imali

su srednju vrednost apsorpcije dva i više puta veću od vrednosti očitane kod negativne kontrole. Srednja vrednost apsorpcije negativne kontrole iznosila je 0,416. Raspored ispitivanih sojeva u pločici, sa vrednostima apsorpcije očitanim na spektrofotometru, prikazan je u **tabeli 15**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.965	0.949	0.994	0.977	0.835	1.156	1.229	0.836	1.227	1.319	
C		1	1	7	7	13	595	595	13	23	23	
D		0.915	0.953	1.045	1.023	1.205	1.396	0.834	0.836	1.040	1.025	
E		2	2	8	8	14	14	18	18	24	24	
F		0.859	0.852	0.876	0.896	1.331	1.395	1.335	1.412	1.115	1.033	
G		3	3	9	9	15	15	19	19	25	25	
H		0.897	0.890	1.040	1.023	0.412	0.420	1.148	1.163	1.644	1.504	
I		4	4	10	10	K ⁻	K ⁻	20	20	K ⁺	K ⁺	
J		0.854	0.929	1.056	1.164	1.163	1.156	1.487	1.441	0.995	0.845	
K		5	5	11	11	16	16	21	21	26	26	
L		0.843	0.829	0.838	0.852	1.120	1.147	0.827	0.852	1.298	1.168	
M		6	6	12	12	17	17	22	22	27	27	
N												

Tabela 15. Raspored ispitivanih sojeva u pločici i vrednosti apsorpcije u ELISA testu.

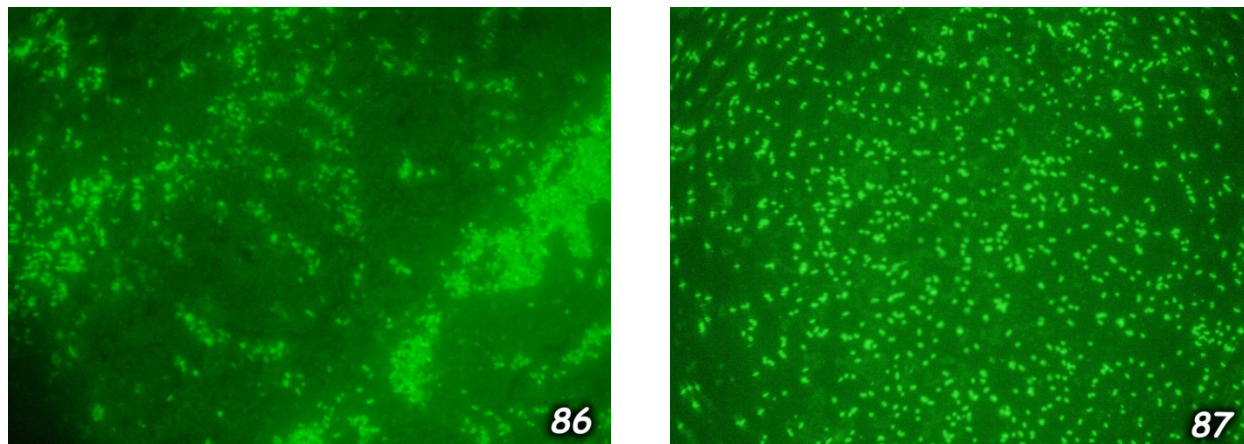
1–27 – ispitivani sojevi; 595 – *E. amylovora* NCPPB; K+ pozitivna kontrola; K- negativna kontrola

5.9.2. IF test

Primenom metode indirektna imunofluorescencije (IIF), sa obeleženim sekundarnim antitelima, kod svih ispitivanih bakterijskih sojeva utvrđena je pozitivna reakcija sa specifičnim antitelima.

U više koraka inkubacije praćeno je vezivanje specifičnih antitela sa antigenima. U prvom koraku, nanošenjem bakterijskih uzoraka u antigena polja i inkubacijom tokom noći, omogućeno je njihovo vezivanje za zidove mikroskopske pločice. U sledećem koraku inkubacije, dodavanjem specifičnih antitela, obezbeđeno je vezivanje antitela za bakterijske antigene. Nastanak kompleksa antitelo–antigen detektovan je u narednom koraku, dodavanjem sekundarnih antitela obeleženih fluorescirajućim markerom (FITC — fluorescein izotiocijanat). Pozitivna reakcija formiranog kompleksa antigen–antitelo učinjena je vidljivom pod fluorescentnim

mikroskopom (100x imerzioni objektiv). Uočene su fluorescentno obojene bakterijske ćelije, u vidu kratkih štapića, koje su emitovale žuto–zelenu fluorescenciju (**Sl. 86 i 87**). Pozitivna reakcija uočena je kod svih ispitivanih sojeva, kao i kod kontrolnog soja *E. amylovora* NCPPB 595.



Slike 86 i 87. Fluorescentne ćelije proučavanih sojeva *E. amylovora* uočene pod fluorescentnim mikroskopom u IF testu (slika levo – izolat EaM3 iz dunje, slika desno – *E. amylovora* NCPPB 595)

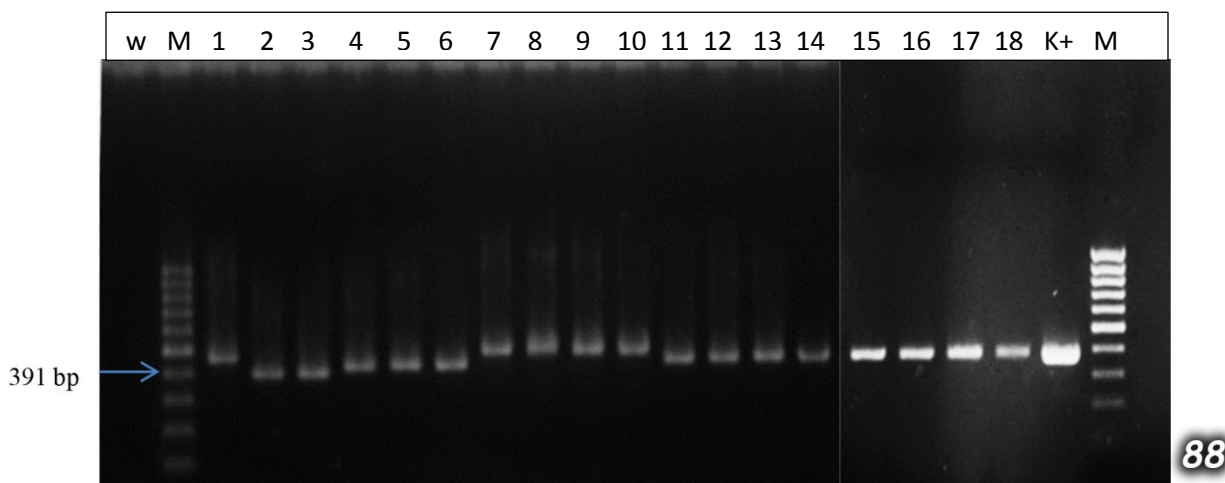
5.10. Molekularne odlike proučavanih sojeva

Primenom više različitih molekularnih tehnika izvršena je identifikacija i proučen genetski diverzitet 18 sojeva *E. amylovora* poreklom iz dunje, kruške, jabuke i gloga, iz različitih lokaliteta u Crnoj Gori. Molekularne analize pokazale su visoku specifičnost i osetljivost u proučavanju odabranih sojeva ove bakterije. Sve primenjene PCR metode omogućile su umnožavanje ciljanih DNK sekvenci bakterije i njihovo međusobno upoređivanje.

5.10.1. Nested PCR

Primenom Nested PCR, svih 18 proučavanih sojeva produkovalo je očekivani specifičan DNK fragment, u vidu jedne amplifikacione trake koja je dobijena vizuelizacijom u agaroznom gelu, čime je potvrđeno da pripadaju vrsti *E. amylovora*. Šest proučavanih sojeva: EaM 11, EaM 12, EaM 43, EaM 48, EaM 49 i EaM 53, kao i referentni soj *E. amylovora* NCPPB 595, imali su fragment očekivane veličine od 391 bp. Pet ispitivanih sojeva: EaM 1, EaM 30, EaM 31, EaM 37 i EaM 38, posedovalo je fragment veličine 447 bp, dok je sedam ispitivanih sojeva: EaM 13, EaM 14, EaM 25, EaM 57, EaM 58, EaM 59 i EaM 60, formiralo fragment od oko 416 bp. Male

varijacije uočene među sojevima, tj. razlika od 56 nukleotida koja se pojavila u veličini dobijenih fragmenata (od 391 do 447 bp), može se objasniti ponavljanjem sekvence od 8 bp (GAATTACA), koja može da varira među sojevima, što navode i drugi autori (Schnabel and Jones, 1998; Llop et al., 2000). Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije DNK (**Sl. 88**).



Slika 88. Produkti amplifikacije DNK proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni u Nested PCR. w–voda (negativna kontrola); M–molekularni marker (100 bp DNA Ladder); Linije 1–18: Ispitivani sojevi 1–18; K+ NCPPB 595.

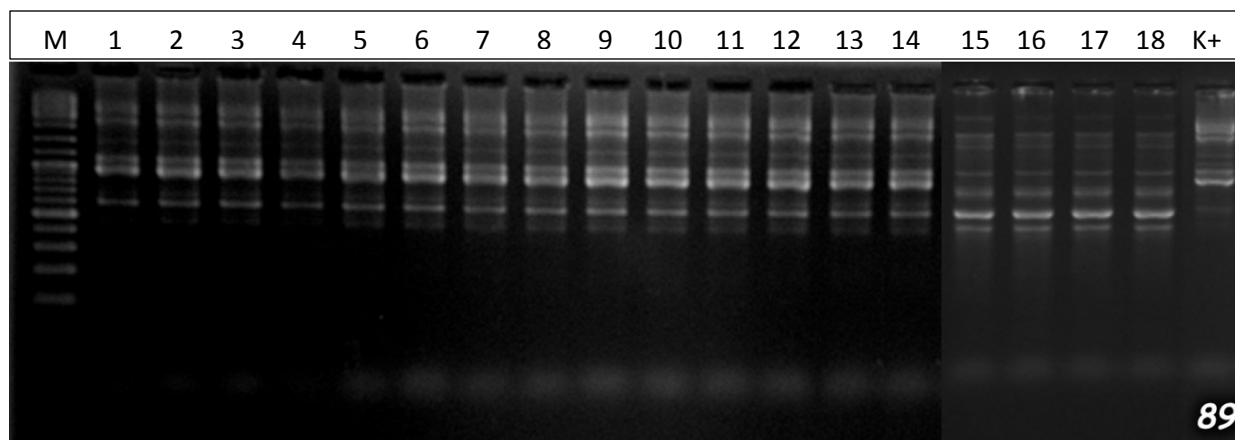
5.10.2. Rep–PCR

Primenom REP, ERIC i BOX prajmera, u tri zasebne PCR reakcije, dobijeni su genetski profili kod svih ispitivanih sojeva.

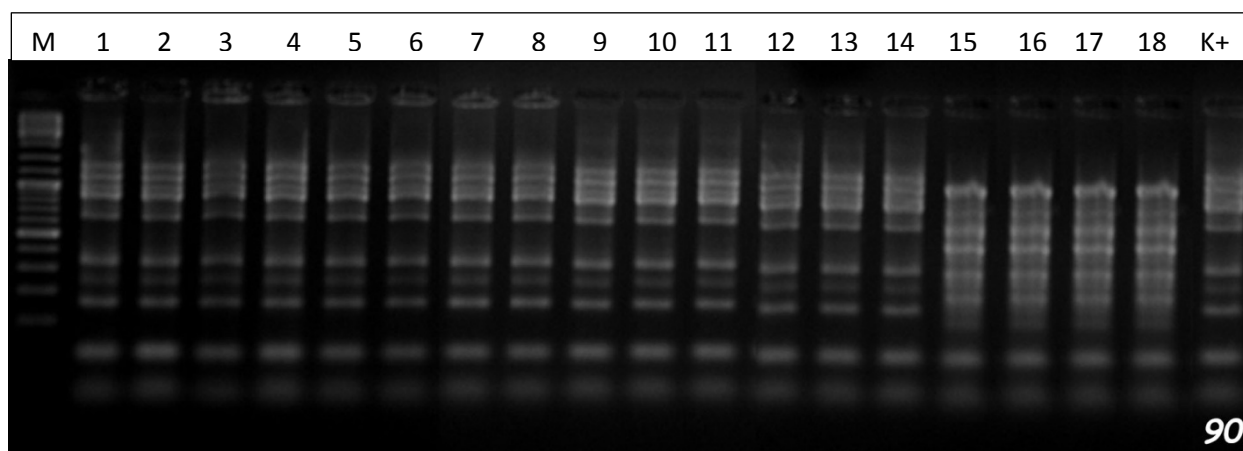
Korišćenjem REP prajmera uočeno je da su se izdvojile dve grupe sojeva. Sojevi iz kruške EaM 43, EaM 48, EaM 49 i EaM 53 (linije 15–18) formirali su jedan tip profila, dok su sojevi iz dunje, jabuke i gloga (linije 1–14), kao i referentni soj (NCPPB 595), formirali drugi tip profila. Svi sojevi iz kruške, nezavisno od lokaliteta, imali su međusobno identične genetske profile, koje je činilo po osam identičnih fragmenata veličine 400 do 4000 bp. Svi sojevi iz dunje, jabuke i gloga, kao i referentni soj, takođe su imali međusobno identične genetske profile i formirali su po osam identičnih fragmenata veličine 400 do 3500 bp (**Sl. 89**).

Korišćenjem ERIC i BOX prajmera takođe su uočene razlike u genetskim profilima između sojeva iz kruške i svih ostalih ispitivanih sojeva.

Primenom ERIC prajmera, sojevi iz kruške EaM 43, EaM 48, EaM 49 i EaM 53 (linije 15–18) formirali su po sedam identičnih DNK fragmenata veličine 100 do 1000 bp, dok je kod svih ostalih sojeva (linije 1–14), uključujući i referentni soj, dobijeno po osam identičnih DNK fragmenata u rasponu od 180 do 1300 bp (**Sl. 90**).

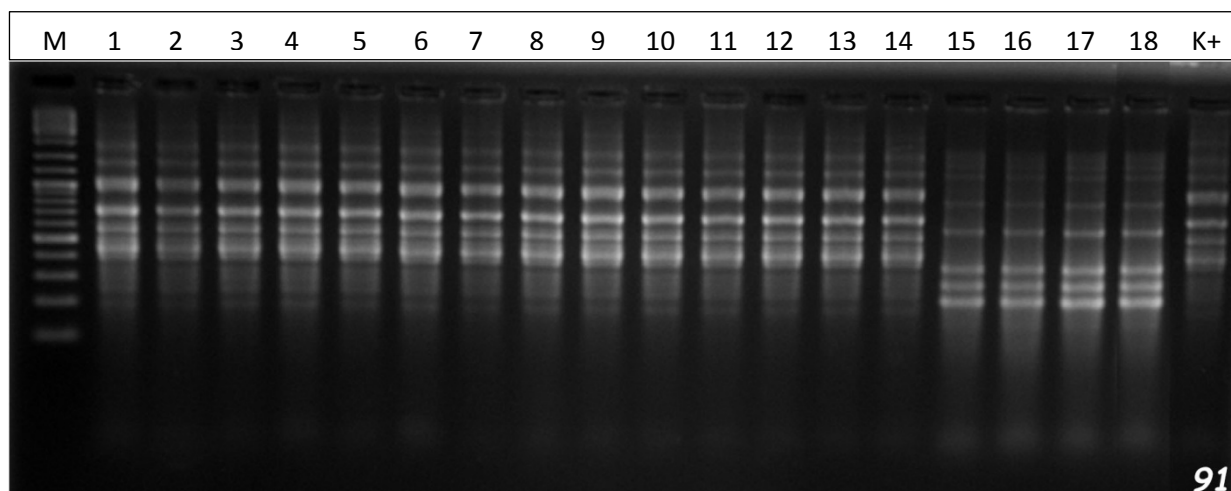


Slika 89. Genetički profili proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem REP prajmera.
M – molekularni marker (Mix DNA Ladder); Linije 1–18:Ispitivani sojevi; K+ NCPPB 595.



Slika 90. Amplifikacioni fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem ERIC prajmera.
M – molekularni marker (Mix DNA Ladder); Linije 1–18:Ispitivani sojevi; K+ NCPPB 595.

U BOX PCR, genetski profili sojeva iz kruške EaM 43, EaM 48, EaM 49 i EaM 53 (linije 15–18), izdvojili su se od svih ostalih sojeva i imali su po devet identičnih fragmenata veličine 200 do 2000 bp. Sojevi iz dunje, jabuke i gloga (linije 1–14), kao i referentni soj, formirali su po 14 identičnih fragmenata veličine 190 do 1900 bp (**Sl. 91**).



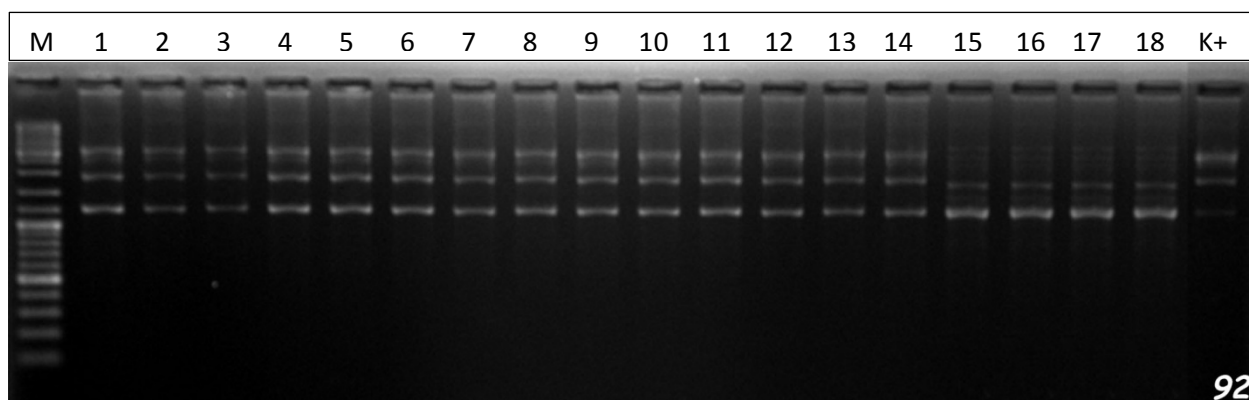
Slika 91. Amplifikacioni fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem BOX prajmera.

M – molekularni marker (Mix DNA Ladder); Linije 1–18: Ispitivani sojevi; K+ NCPBP 595.

5.10.3. RAPD PCR

PCR amplifikacije korišćenjem dva random prajmera (CUGEA3 i CUGEA5) rezultirale su produkcijom RAPD fragmenata kod svih ispitivanih sojeva. Oba korišćena prajmera pokazala su visoku moć diskriminacije, izdvajajući sojeve iz kruške od svih ostalih proučavanih sojeva.

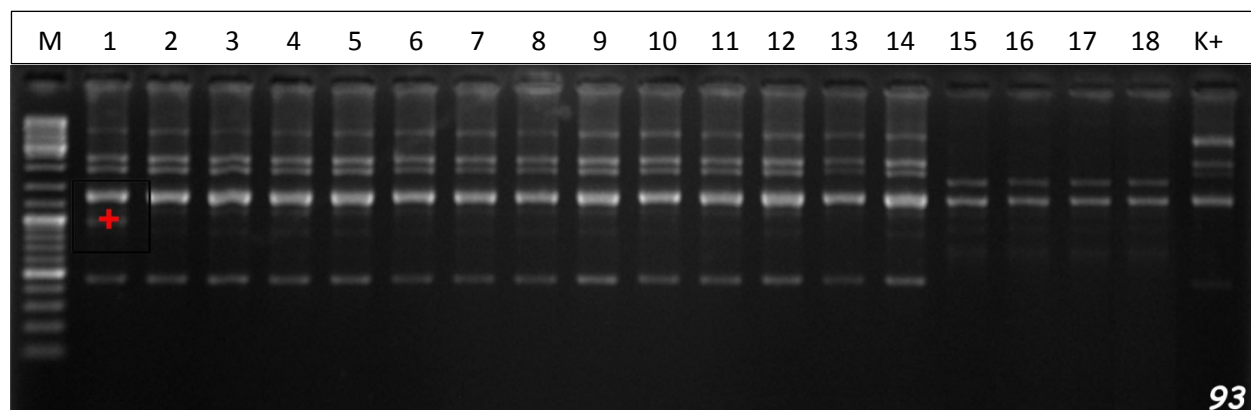
Primenom CUGEA3 prajmera, kod sojeva iz kruške EaM 43, EaM 48, EaM 49 i EaM 53 (linije 15–18) dobijeno je po šest identičnih fragmenata veličine 1000 do 3500 bp, dok je kod sojeva iz dunje, jabuke i gloga (linije 1–14), kao i kod pozitivne kontrole, uočeno po četiri identična fragmenta veličine 1200 do 3000 bp (**Sl. 92**).



Slika 92. RAPD fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijenih korišćenjem CUGEA3 prajmera.

M – molekularni marker (Mix DNA Ladder); Linije 1–18: Ispitivani sojevi; K+ NCPBP 595.

Primenom CUGEA5 prajmera, kod sojeva iz kruške EaM 43, EaM 48, EaM 49 i EaM 53 (linije 15–18) dobijeno je po pet identičnih profila u rasponu od 700 do 1500 bp, dok je po sedam identičnih profila u rasponu od 500 do 5000 bp dobijeno kod sojeva iz dunje, jabuke i gloga (linije 1–14). U grupi sojeva iz dunje, jabuke i gloga, uočen je diskretni polimorfizam kod jednog soja iz dunje, pod šifrom EaM 1 (linija 1), kod kojeg je bio prisutan fragment veličine 1000 bp, koji nije uočen kod ostalih sojeva iz ove grupe. Referentni soj imao je sličan genetski profil kao i sojevi iz dunje, jabuke i gloga, s tom razlikom što kod njega nisu uočena dva fragmenta, jedan od 850 bp, a drugi od 1100 bp (**Sl. 93**).



Slika 93. RAPD fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem CUGEA5 prajmera.

M – molekularni marker (Mix DNA Ladder); Linije 1–18: Ispitivani sojevi; K+ NCPPB 595;
+ prisustvo fragmenta veličine 1000 bp kod soja EaM 1.

6. DISKUSIJA

U Crnoj Gori simptomi bakterijske plamenjače prvi put su zapaženi 1993. godine na stablima kruške, u opštinama Berane i Andrijevica (Panić i Arsenijević, 1996). Epifitotična pojava bolesti registrovana je na dunji 2003. godine, u Bijelom Polju, Beranama, Mojkovcu i Nikšiću (Obradović i sar., 2003), kada je izvršena i izolacija bakterije iz prikupljenih uzoraka. Arsenijević i Gavrilović (2007) navode da je prisustvo *E. amylovora* eksperimentalno dokazano 2003. godine na jabuci u okolini Nikšića. Od tada nema literaturnih podataka o pojavi ove bakterije u Crnoj Gori.

Istraživanjem sprovedenim u okviru rada na disertaciji dobijeni su precizniji podaci o prisustvu, rasprostranjenosti, krugu domaćina i štetnosti *E. amylovora* u Crnoj Gori. Rezultati istraživanja pokazali su da je *E. amylovora* prisutna i široko rasprostranjena na području Crne Gore, najviše u severoistočnom i zapadnom delu zemlje, gde je zastupljena voćarska proizvodnja. Zdravstveni pregledi jabučastih voćnih vrsta koji su obuhvatili veće i manje zasade, kao i pojedinačna stabla na okućnicama, ukazali su na prisustvo bakterije i njeno širenje u kontinentalnom delu zemlje, kako teritorijalno, tako i pojavom novih domaćina.

Pojaва bakterijske plamenjače utvrđena je na dunji (*Cydonia oblonga*), krušci (*Pyrus communis*), jabuci (*Malus domestica*), mušmuli (*Mespilus germanica*) i glogu (*Crataegus* sp). Dve poslednje navedene biljne vrste se prvi put navode kao domaćini *E. amylovora* u Crnoj Gori. S obzirom na ranije podatke iz literature o dunji, jabuci i krušci kao domaćinima bakterije (Panić i Arsenijević, 1996; Obradović i sar., 2003; Arsenijević i Gavrilović, 2007) ova istraživanja potvrdila su da se krug domaćina *E. amylovora* u poslednjih 10–ak godina u Crnoj Gori proširio, jer je njeno prisustvo utvrđeno i na mušmuli i na glogu (Balaž i sar., 2021).

Najugroženija voćna vrsta u Crnoj Gori je dunja, koja je uglavnom prisutna na okućnicama (pojedinačna stabla), a veoma malo u zasadima, u intenzivnijoj proizvodnji. Na skoro svim pregledanim stablima dunje jasno se manifestuju simptomi bakterijske plamenjače, a posebno u opštinama Berane i Bijelo Polje. Intenzitet zaraze krune je najčešće oko 30%, a često i znatno veći (60%). Dominantni simptomi su plamenjača cveta i plamenjača mladara, koji se manifestuju mrkom nekrozom ovih biljnih organa. Dužina nekroze mladara obično iznosi 15–20 cm. Van der Zwet and Beer (1999) ističu da u povoljnim uslovima za razvoj bolesti, infekcija na mladima i grančicama može progresivno da se proširi za 15–30 cm i više, za svega nekoliko dana. Prvi simptomi kod dunje uočeni su rano, već tokom cvetanja, u vidu sušenja zaraženih cvetova. Zapaženo je postepeno širenje bakterije iz cvetova u cvetne drške, koje dobijaju mrku boju i propadaju. Uočeno je i širenje bakterije u listove duž lisnih nerava u vidu tamne nekroze, nakon čega dolazi do sušenja zaraženog lišća koje ostaje da visi na granama.

Jak intenzitet pojave bakteriozne plamenjače na dunji u Crnoj Gori ukazuje na sličan trend koji ova bakterija ima u Srbiji (Panić i Arsenijević, 1996; Balaž i sar., 1997, 2004; Obradović i sar., 2003; Arsenijević i Gavrilović, 2007). Dunju kao jednu od najugroženijih voćnih vrsta od bakteriozne plamenjače, ističu i drugi autori iz zemalja u okruženju (Cvjetković et al., 1999; Nemeth, 1998; Bobev et al., 1998; Saygili, 2006). Zaražena stabla dunje predstavljaju značajan izvor inokuluma za nove infekcije i širenje bakterije (Balaž i sar., 2012). Kao posledica jake zaraze bakterioznom plamenjačom, kao i zbog nesprovođenja sanitarnih i hemijskih mera kontrole, poslednjih godina u Crnoj Gori osušena su i propala brojna pojedinačna stabla dunje u opštinama Bijelo Polje i Berane.

Jabuka i kruška su u Crnoj Gori uglavnom znatno ređe i slabije zaražene bakterioznom plamenjačom (sporadična zaraza), u vidu plamenjače mladara koja se širi od cveta. Intenzitet zaraze kod ovih voćnih vrsta najčešće se kreće od 5% do 10%. Na krušci je u opštini Nikšić, u nekoliko zasada, zapažen i nešto jači intenzitet zaraze (30%).

Osim dunje, kruška se na ovom području takođe pokazala osetljivom prema *E. amylovora*, o čemu govore i podaci drugih autora iz okruženja (Panić i Arsenijević, 1996; Arsenijević i Gavrilović, 2007). Karakteristični simptomi bolesti na ovoj voćnoj vrsti na istraživanim lokalitetima, uočeni su u vreme intenzivnog porasta mladara, tokom juna, u vidu njihovog uvenuća od vrha ka osnovi i savijanja u obliku „pastirskog štapa”. Ova faza bolesti nastupa obično u kasno proleće i rano leto, kada je na stablu prisutno najviše izdanaka koji aktivno rastu. U velikom broju slučajeva, na infekciju ovih organa otpada 50% ukupne zaraze i često samo oni oboleavaju (van der Zwet and Keil, 1979). Međutim, treba istaći da plamenjača mladara nanosi manje štete nego plamenjača cvasti i plodova, pre svega zbog toga što se potencijalne štete mogu eliminisati pravovremenim uklanjanjem obolelih mladara, uz dezinfekciju pribora za rezidbu. Pored toga, bakterija kroz mladare neuporedivo teže dospeva do višegodišnjih grana, nego kroz cvasti, koje inficira veoma brzo i lako, prouzrokujući velike štete (Gavrilović, 1998). Kod kruške je čest simptom uočen na terenu nekroza mladih, tek formiranih plodića, kao i nekroza na starijim plodovima. Zapaženo je da propada i spoljašnje i unutrašnje tkivo ploda. Oboleli plodovi uglavnom pocrne, smežuravaju se, suše i zajedno sa lišćem ostaju dugo da vise na rodnim grančicama (Panić i Arsenijević, 1996).

Posmatranjem osetljivosti gajenih sorti na terenu, uočeno je da je najjači intenzitet zaraze na sorti dunje Leskovačka (uglavnom zastupljenoj na ovim prostorima), na sortama jabuke Ajdared i Jonatan, a kod kruške na sortama Viljamovka, Santa Marija i Junska lepotica, što se podudara sa podacima iz literature (van der Zwet and Beer, 1995; Arsenijević i Gavrilović, 2007). Uočeno je da naročito brzo propadaju zaražena mlada stabla ovih voćnih vrsta, vrlo često već u prvim godinama nakon sadnje. Usled jake zaraze bakterioznom plamenjačom iskrčen je mladi zasad dunje u četvrtoj godini nakon sadnje. Ovaj zasad obuhvatao je 1000 stabala na površini od 0,6 ha, u naselju Potkrajci, u opštini Bijelo Polje, u vlasništvu preduzeća koje se bavi preradom voća. Panić i Arsenijević (1996) takođe navode da je bakteriozna plamenjača posebno

štetna za mlada voćna stable dunje i kruške, kod kojih može izazvati potpuno sušenje i propadanje u toku samo jedne sezone.

Simptomi bakteriozne plamenjače na mušmuli (naselje Rasovo, Bijelo Polje) javili su se u vidu plamenjače cveta, koja je zahvatila i nekoliko okolnih listova. Kako ističe Gavrilović (2009), domaća mušmula je veoma osetljiva prema *E. amylovora*, koja ozbiljno ugrožava njeno uspešno gajenje. U Crnoj Gori nema zasada pod ovom voćnom vrstom, ali upravo zbog njene osetljivosti prema ovoj bakteriji treba dobro planirati lokalitete za eventualne buduće zasade.

Zaražene biljke gloga uočene su u neposrednoj blizini zasada kruške (naselje Kisjele Vode, Bijelo Polje), ali i na neobrađenom zemljištu, pored puta (naselje Petnjik, Berane), gde nije bilo zasada jabučastih voćaka u blizini. Simptomi na glogu manifestuju se u vidu plamenjače cvasti, listova i zeljastih grančica, jakog intenziteta. Ovde treba istaći značaj pojave bakteriozne plamenjače na glogu, biljci ukrasne flore koja je veoma osetljiva prema *E. amylovora*. Prema podacima iz literature, 13 vrsta roda *Crataegus* je osetljivo prema ovom patogenu (van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1995). Kako navodi Gavrilović (2010), bakteriozna plamenjača pojavljuje se na biljkama spontane flore na okućnicama i u blizini zasada jabučastih voćaka, ali je potvrđena i u populaciji biljaka izvan naseljenih mesta i u područjima gde nema intenzivne proizvodnje jabučastih voćaka. Uzimajući u obzir činjenicu da je glog široko raspostranjena biljka spontane flore zastupljena u ravničarskim, ali i u brdsko–planinskim predelima, čak i na visinama od preko 1000 m, ona može predstavljati značajan izvor inokuluma za širenje bakterije na jabučaste voćke (van der Zwet and Keil, 1979; Panić i Arsenijević, 1996; Vojinović i Gavrilović, 2009). Berrie i Billing (1996) ističu da je glog najvažnija biljka domaćin i glavni izvor inokuluma za razvoj bakteriozne plamenjače na jabuci i krušci u voćnjacima u Engleskoj. Naročito je značajno ukoliko se glog nalazi u blizini zasada jabuke i kruške.

Prisustvo simptoma bakteriozne plamenjače koje je utvrđeno na vrstama divlje kruške i jabuke, kao i na usamljenim starim stablima dunje, jabuke i kruške, na međama i utrinama, govori u prilog činjenici da oni predstavljaju žarišta za širenje infekcije, jer se ovakva obolela stabla ne uklanjaju i ne uništavaju (Zeller, 1974, prema: Vojinović, 2005). Gavrilović (2010) navodi da ove biljke imaju važnu ulogu u širenju bakterije i njenoj epidemiologiji.

Na osnovu terenskih istraživanja možemo zaključiti da je *E. amylovora* u Crnoj Gori veoma rasprostranjena i da je proširila krug domaćina, čak i u područjima gde nema intenzivnog gajenja jabučastih voćaka, kao njenih glavnih domaćina (Radunović i sar., 2013). Ova činjenica u znatnoj meri otežava iznalaženje izolovanih zona u kojima bi se mogla zasnovati proizvodnja zdravstveno ispravnog sadnog materijala, kao osnovne mere suzbijanja ove bakterije (Vojinović i Gavrilović, 2009).

Praćenjem uticaja meteoroloških faktora na pojavu simptoma bakteriozne plamenjače u klimatski različitim regionima Crne Gore, dobijeni su podaci o njihovoj tesnoj međusobnoj zavisnosti (Radunović i sar., 2015a; 2015b). Jak intenzitet pojave *E. amylovora* na dunji u severo-istočnim (lokalitet Bijelo Polje) i zapadnim delovima zemlje (lokalitet Nikšić), može se objasniti

poklapanjem vremena cvetanja ove voćne vrste sa dužim kišnim periodima i temperaturama optimalnim za ostvarivanje infekcija cveta, što zatim uslovljava brzo širenje bakterije kroz mladare, tanje i deblje grane. Zbog kasnijeg cvetanja u odnosu na druge jabučaste voćne vrste, dunja je u ovim uslovima najugroženija i štete su na njoj najveće. Period cvetanja dunje svake godine prate temperature koje pogoduju ostvarenju infekcija bakterijom *E. amylovora*. Prva pojava simptoma na dunji uočava se obično krajem maja do polovine juna, kada nakon dužeg kišovito i prohladnog perioda dođe do porasta temperature (preko 20 °C) (Radunović i Gavrilović, 2013). Ovaj podatak ne iznenađuje jer je temperatura jedan od ključnih, ali i limitirajućih faktora razvoja i širenja bakterije (van der Zwet and Beer, 1999).

Slabiji intenzitet zaraze jabuke i kruške registrovan tokom proleća na lokalitetima Bijelo Polje i Nikšić, u vezi je sa temperaturama nižim od optimalnih tokom fenofaze cvetanja i porasta mladara ovih voćnih vrsta (Balaž i sar., 2012). Period cvetanja jabuke i kruške redovno prati relativno hladno vreme, a niske noćne temperature (<10 °C) u periodu punog cvetanja ovih voćnih vrsta doprinose redukciji brojnosti bakterijske populacije *E. amylovora*. Odgovarajuće više temperature praćene vlagom, nastupaju kasnije, kada jabuka i kruška već završavaju cvetanje. Iz tih razloga, ostvaruju se samo malobrojne infekcije slabog intenziteta, odnosno infekcije kasnije otvorenih cvetova, usled čega su na ovim voćnim vrstama uočene uglavnom slabije sporadične zaraze, u vidu pojedinačnih nekrotiranih grančica ili pojedinačnih suvih cvetova.

Pri analizi intenziteta pojave određenih tipova simptoma treba imati u vidu da osetljivost raznih organa prema *E. amylovora*, kod istog domaćina, može biti različita (Persen et al., 2011).

Udaljavanjem od zona koje su prepoznate kao glavna žarišta bakterije (Bijelo Polje i Berane), ka centralnim kontinentalnim delovima zemlje (opština Mojkovac), intenzitet zaraze se smanjuje, a simptomi bakteriozne plamenjače se ispoljavaju u manjoj meri, na pojedinačnim stablima dunje, kruške i jabuke. Uzrok ovome je, pre svega, u manje povoljnim klimatskim uslovima za razvoj bakterije. Takođe, na ovim prostorima ne postoje značajniji intenzivniji zasadi jabučastog voća, već su uglavnom zastupljene stare autohtone sorte u vidu pojedinačnih stabala starosti preko 20 godina. Ovo područje karakteriše sporadična pojava bakterije i to je praktično zona koja se nalazi između najugroženijih severnih regiona i centralnih ravničarskih regiona u kojima nije utvrđeno prisustvo bakterije.

Pojedinačni, izolovani slučajevi pojave simptoma bakteriozne plamenjače, uglavnom na po jednom stablu ili jednoj grani dunje, u opštinama Pljevlja i Cetinje, kao i u malom obimu u jednom zasadu kruške u opštini Bar, karakterišu područja u kojima se relativno lako, primenom mehaničkih mera rezidbe zaraženih biljnih delova, bakterija može praktično eliminisati.

Područje opština Plužine, Žabljak i Šavnik nalazi se u visokoplaninskoj zoni, čija su obeležja duge i oštre zime sa snegom i nepovoljni uslovi za gajenje jabučastih voćnih vrsta. Na ovom području uglavnom je prisutna šljiva, dok se, na okućnicama, nalaze, ali veoma retko, stara pojedinačna stabla dunje, kruške i jabuke. To su razlozi zbog kojih i nema prisustva bakterije.

U centralnom, ravničarskom delu Crne Gore, na području opština Podgorica i Danilovgrad, nije uočeno prisustvo simptoma bakteriozne plamenjače na osetljivim voćnim vrstama, što se može objasniti nepovoljnim uticajem meteoroloških faktora na ostvarivanje infekcije, širenje i održavanje bakterije u prirodi. Odsustvo padavina i optimalnih temperatura tokom cvetanja jabučastih voćnih vrsta, u kombinaciji sa niskom relativnom vlažnošću, što je jedna od odlika klime na ovom području, pokazali su se kao limitirajući faktori za ostvarivanje infekcije. Zbog nepovoljnih meteoroloških faktora, biljke praktično „izbegavaju” zarazu u vreme cvetanja, najkritičnijoj fazi u razvoju bolesti, usled čega i ne dolazi do ispoljavanja simptoma (Radunović i Gavrilović, 2013). Odsustvo simptoma bakteriozne plamenjače na spontanim i ukrasnim vrstama koje su domaćini bakterije (glog, vatreni trn i polegla dunjarica), govori u prilog činjenici da na ovim lokalitetima nema ni održavanja bakterije u prirodi, u vidu inokuluma koji bi omogućio njeno prenošenje na jabučaste voćne vrste.

U južnom, primorskom delu zemlje (opštine Ulcinj, Budva, Tivat, Kotor i Herceg Novi), nisu uočeni simptomi bakteriozne plamenjače, što je takođe u vezi sa meteorološkim faktorima koji onemogućavaju infekcije. Osim toga, na ovom području pretežno se gaje agrumi i maslina, te praktično i nema zasada jabučastih voćnih vrsta. Prisustvo simptoma nije uočeno ni na domaćinima iz spontane i ukrasne flore, na kojima bi bakterija mogla da se održava i prenosi. S obzirom da su simptomi bakteriozne plamenjače utvrđeni u manjem obimu samo u jednom zasadu kruške (naselje Mrkojevići, lokalitet Bar), zaključujemo da je bakterija najverovatnije preneti zaraženim sadnim materijalom, prilikom podizanja zasada, a da su nepovoljni meteorološki faktori onemogućili njeno dalje širenje i jače infekcije.

Rezultati ovih istraživanja pokazuju da su zasadi dunje, kruške i jabuke, sa većim stepenom zaraze, kao i pojedinačna jako zaražena stabla ovih voćnih vrsta, u severo-istočnom (opštine Bijelo Polje i Berane) i zapadnom delu zemlje (opština Nikšić), glavna žarišta bakterije iz kojih se ona širi na nova područja i nove biljke domaćine (Radunović i Gavrilović, 2013). Imajući u vidu prisustvo *E. amylovora* u ovim voćarskim regionima, u kojima je već prouzrokovala značajne štete, velika je verovatnoća da ova bolest može postati najvažniji ograničavajući faktor u proizvodnji jabučastog voća u Crnoj Gori (Radunović i Gavrilović, 2013). Upravo zbog toga, kao i zbog činjenice da se površine pod jabučastim voćnim vrstama intenzivno povećavaju, prisustvu bakterije i praćenju njenog širenja mora se posvetiti posebna pažnja, u cilju uspostavljanja organizovanog monitoringa i mera kontrole na nivou države (Balaž i sar., 2012; Radunović i Gavrilović, 2013). Podaci o prisustvu i rasprostranjenosti *E. amylovora* koji su dobijeni tokom istraživanja mogu poslužiti kao dobra preporuka poljoprivrednim proizvođačima pri izboru lokaliteta za podizanje zasada jabučastih voćnih vrsta, u cilju sprečavanja pojave i širenja bakteriozne plamenjače.

Kontrola *E. amylovora* nije jednostavna, jer se odgovarajući baktericidi moraju primeniti preventivno, pre nego što se bolest raširi. Najveću efikasnost u suzbijanju ove bakterije pokazali su antibiotici, ali u većini Evropskih zemalja oni nisu registrovani za zaštitu biljaka (Arsenijević,

1997; Gavrilović, 2009). Upravo iz tih razloga, poznavanje rasprostranjenosti bakterije i kruga domaćina na posmatranom području, kao i drugih faktora značajnih za njenu epidemiologiju, od velike su važnosti u suzbijanju. Thomson (2000) ističe da je poznavanje i razumevanje epidemiologije bakterije od presudnog značaja u kontroli bolesti. Na osnovu ovih saznanja moguće je pronaći slabe tačke ili područja gde bakterija može biti redukovana ili eliminisana.

Laboratorijski deo istraživanja obavljen je u Laboratoriji za mikrobiologiju Biotehničkog fakulteta u Podgorici i u Fitopatološkim laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu. Izolacija bakterije iz prikupljenih biljnih uzoraka izvršena je u cilju njene identifikacije. Za proučavanje je odabrano 60 izolata poreklom iz pet domaćina, sa više različitih lokaliteta u Crnoj Gori. Detaljno su proučene njihove patogene, odgajivačke, morfološke i biohemijsko-fizioloških odlike. Osim ovih standardnih bakterioloških testova, primenjene su i serološke i molekularne metode. Serološke analize (ELISA i IF test) obuhvatile su 27 odabranih sojeva *E. amylovora* poreklom iz dunje, kruške, jabuke i gloga, iz različitih područja u Crnoj Gori. Molekularne metode prvi put su primenjene u proučavanju *E. amylovora* u Crnoj Gori. Za molekularne analize odabrano je 18 sojeva *E. amylovora* poreklom iz dunje, kruške, jabuke i gloga, sa različitih lokaliteta, izolovanih u periodu od 2012. do 2015. godine. Primenjeno je nekoliko PCR metoda: Nested PCR (Llop et al., 2000), rep-PCR (Versalovic et al., 1991, 1994; Louws et al., 1994) i RAPD PCR (Momol et al., 1997).

U testu patogenosti, veštačkom inokulacijom mladih zelenih plodova kruške i šljive, svi ispitivani izolati prouzrokovali su nekrotične promene, sa pojavom kapi bakterijskog eksudata, 3–4 dana nakon inokulacije. Ovaj test naročito je značajan u razlikovanju *E. amylovora* od *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, koja takođe prouzrokuje nekrozu, ali bez pojave bakterijskog eksudata (Panić i Arsenijević, 1996; Gavrilović, 2006). Za proveru patogenosti *E. amylovora* mogu se koristiti i plodovi koštičavih voćaka (višnje i šljive). Nekrotične promene praćene pojavom bakterijskog eksudata, nastaju na plodovima šljive (sorta Stenlej) već nakon 36–48 h, na čitavoj površini ploda. Ovo navodi na zaključak da su za dokazivanje patogenosti *E. amylovora* plodovi šljive pogodniji od kruške, što ističu i drugi autori (Arsenijević, 1997). Svi proučavani izolati u ovom istraživanju prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju na listovima duvana i muškatle, u vidu nekroze, 24 h nakon inokulacije. Ovi testovi lako se sprovode u laboratorijskim uslovima i neophodni su kao deo kompleksa testova u cilju uspešne identifikacije *E. amylovora* (Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998).

Morfološke karakteristike proučavanih izolata su sledeće: bakterijske ćelije su štapićastog oblika sa zaobljenim krajevima, reakcija po Gramu je negativna.

U pogledu odgajivačkih odlika ustanovljena je homogenost među proučavanim izolatima *E. amylovora*. Naročito pogodnim za proučavanje izgleda kolonija pokazale su se mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (NAS) i King–ova podloga B (KB). Na prvoj podlozi bakterija formira karakteristične kolonije „levan” tipa, a na drugoj podlozi kolonije su

bez fluorescentnog pigmenta. Ovo su veoma važna svojstva *E. amylovora*, pa se njeno prisustvo prilikom izolovanja već naslućuje na osnovu izgleda kolonija (Gavrilović, 1998). King B podloga koristi se kao diferencijalna za razlikovanje od *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* koja fluorescira na KB (Gavrilović, 1998; Sobiczewski et.al, 1997). Prilikom izolacije, osim kolonija tipičnih za *E. amylovora*, primećene su i atipične kolonije žute boje, koje verovatno pripadaju vrsti *E. herbicola*, koja se često nalazi kao epifit na cvetovima i listovima voćaka i redovni je pratilac *E. amylovora* (Arsenijević, 1988; Arsenijević i Mitrev, 1995). Crosse–Goodman–ova podloga takođe ima poseban značaj u identifikaciji *E. amylovora*, jer krateri koji se formiraju na površini kolonija imaju dijagnostički karakter (Brown et al., 1996, prema: Gavrilović, 1998).

Ostale odgajivačke odlike proučavanih izolata, kao što su razvoj pri 34 °C i 36 °C i razvoj u podlozi sa 5% i 7% NaCl, identični su rezultatima drugih autora (Psallidas, 1990, prema: Panić i Arsenijević, 1996).

Proučavani izolati *E. amylovora* poreklom sa različitih domaćina ispoljili su izrazitu uniformnost u pogledu biohemijsko–fizioloških odlika, što se navodi i u podacima drugih autora (Kim et al., 1996; Gavrilović, 1998). U pogledu korišćenja ugljenih hidrata svi proučavani izolati razlažu glukozu i u aerobnim i u anaerobnim uslovima, što je jedna od važnijih odlika bakterija iz roda *Erwinia*. Ovaj test može poslužiti i kao diferencijalni u odnosu na *P. syringae* pv. *syringae*, koja glukozu razlaže samo u aerobnim uslovima (Gavrilović, 1998). Neke biohemijske odlike povezane su i sa patogenošću izolata *E. amylovora*, kao npr. stvaranje levana i aktivnost katalaze. Utvrđeno je da izolati koji ne stvaraju levan na podlozi bogatoj saharozom, prouzrokuju nekrotične promene slabijeg intenziteta na veštački inokulisanim sejancima kruške. Takođe, sojevi *E. amylovora* koji imaju smanjenu aktivnost katalaze su i slabije virulentni (Laby and Beer, 1996, prema: Gavrilović, 1998). U ovom istraživanju, svi proučavani izolati stvaraju katalazu (ali ne i oksidazu) i produkuju levan na mesopeptonskoj podlozi sa saharozom. Svi ispitivani izolati hidrolizuju želatin, ali ne i skrob, eskulin i Tween 80. U pogledu korišćenja azotnih jedinjenja, ne stvaraju amonijak i ne redukuju nitrate. Svi proučavani izolati pokazuju osetljivost prema streptomycinu i hloramfenikolu. Identično se ponašaju i referentni sojevi, te se može zaključiti da je u pogledu ovih odlika populacija *E. amylovora* u Crnoj Gori homogena (Radunović i sar., 2013).

Ovim istraživanjem su po prvi put u Crnoj Gori primenjene serološke i molekularne tehnike u identifikaciji i diferencijaciji sojeva *E. amylovora*. Primena ovih metoda omogućila je brzu dijagnostiku bakterije i istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka za kratko vreme, kao i dokazivanje bakterije u niskim koncentracijama u biljnom materijalu. Uzimajući u obzir činjenicu da se površine pod jabučastim voćem u Crnoj Gori iz godine u godinu povećavaju (Statistički godišnjak Crne Gore, 2013), postoji opasnost da ova bakterija u narednom periodu ostvari infekciju velikog broja biljaka i prouzrokuje smanjenje broja stabala dunje, kruške i jabuke. Zbog toga je brza identifikacija bakterije primenom savremenih seroloških i molekularnih metoda

veoma važna, jer skraćuje vreme potrebno za detekciju i omogućava pravovremenu primenu odgovarajućih mera suzbijanja (Radunović i sar., 2015a).

Više autora navodi da su ELISA i IF test pouzdane i specifične serološke metode za detekciju *E. amylovora* u biljnom materijalu, naročito popularne i praktične za primenu u laboratorijama (Lelliot and Stead, 1987; Schaad et al., 2001; Gavrilović, 2009). Serološke metode omogućavaju brzu detekciju bakterije, istovremeno u velikom broju uzoraka i za relativno kratko vreme, kao i detekciju bakterije u niskim koncentracijama u biljnom materijalu (McLaughlin et al., 1989; Schaad et al., 2001; Janse, 2006). Ove metode se posebno preporučuju prilikom kontrole zdravstvenog stanja sadnog materijala jabučastih voćaka (Lopez et al., 2002). Primena seroloških metoda naročito je pogodna u zemljama u kojima se bakteriorna plamenjača nije pojavila, jer u tim slučajevima ne postoje odgovarajući kontrolni izolati, te se koristi referentni soj za poređenje rezultata (Jones and Geider, 2001).

U primeni navedenih seroloških tehnika prisutan je problem nedovoljne specifičnosti i senzitivnosti pri korišćenju poliklonalnih antiseruma, koji često detektuju i neke druge bakterije koje se mogu naći na površini biljnog tkiva ili u okviru lezija, u asocijaciji sa *E. amylovora*, kao što su *E. herbicola*, *E. uredovora* i *Pseudomonas fluorescens* (Calzolari et al., 1982; Paulin, 2000). Ovaj problem uspešno se rešava primenom monoklonalnih antitela koja se odlikuju većom specifičnošću, kao i primenom više različitih dijagnostičkih testova (Lin et al., 1987; McLaughlin et al., 1989; Gorris et al., 1996).

U ovom istraživanju, primenom serološke metode PTA ELISA na mikrotitarskoj pločici, utvrđeno je da svi ispitivani sojevi reaguju sa specifičnim antitelima i poseduju iste serološke osobine kao bakterija *E. amylovora*. Primenom metode indirektne imunofluorescencije (IIF), sa obeleženim sekundarnim antitelima, kod svih ispitivanih bakterijskih sojeva utvrđena je pozitivna reakcija sa specifičnim antitelima. Na osnovu seroloških karakteristika ispitanih u ELISA i IF testu, zaključeno je da svi proučavani sojevi pripadaju vrsti *E. amylovora*. Utvrđena je homogenost u antigenoj strukturi 27 sojeva poreklom sa dunje, kruške, jabuke i gloga, sa različitih lokaliteta (Radunović i sar., 2015a).

U ovom istraživanju, prvi put u Crnoj Gori, primenjene su molekularne metode u proučavanju genetske varijabilnosti *E. amylovora* (Radunović et al., 2017). Ove metode pokazale su visoku specifičnost i osetljivost u identifikaciji i diferencijaciji 18 proučavanih sojeva iz dunje, jabuke, kruške i gloga, sa različitih lokaliteta u zemlji. Primenom više molekularnih tehnika omogućeno je razdvajanje sojeva prema genetskoj strukturi i njihovo međusobno upoređivanje i proučavanje.

Uvođenje molekularnih metoda, a posebno reakcije lančanog umnožavanja fragmenata DNK (PCR reakcija), predstavlja pravu prekretnicu u savremenoj identifikaciji fitopatogenih bakterija. Različite modifikacije ove metode omogućile su utvrđivanje razlika među sojevima poreklom sa različitih lokaliteta i domaćina. Početkom 90-tih godina prošlog veka molekularne metode našle su primenu u detekciji *E. amylovora* (Bereswill et al., 1992). Molekularne metode

su visoko osjetljive, specifične i brze (Obradović i Kevrešan, 2010). Prednost ovih metoda u odnosu na ostale je mogućnost detekcije bakterije u uzorcima bez simptoma i u uzorcima u kojima je koncentracija bakterije niska (manje od 10^5 CFU/ml) (Bereswill et al., 1992).

Nested PCR je tehnika koja omogućava istovremeno korišćenje dva para prajmera u dve PCR reakcije, koje se odvijaju jedna za drugom u istoj tubi. Na taj način, obezbeđuje se viši stepen senzitivnosti, skraćuje se vreme detekcije i smanjuje se mogućnost kontaminacije, što ovu metodu svrstava u rutinske metode za detekciju *E. amylovora* u biljnom materijalu (Llop et al., 2000). Nested PCR posebno je značajna za detekciju bakterije u biljnom materijalu na kome se ne uočavaju znaci bolesti, što je od velike važnosti u proizvodnji zdravstveno ispravnog sadnog materijala (Llop et al., 2000; Gavrilović, 2009).

U ovom istraživanju, primenom Nested PCR svi proučavani sojevi produkovali su očekivani DNK fragment plazmida pEA29 kb, u vidu amplifikacione trake uočene vizuelizacijom na agaroznom gelu, čime je potvrđena pripadnost vrsti *E. amylovora*. Male varijacije među sojevima, tj. razlika od 56 nukleotida koja se pojavila u veličini dobijenih fragmenata (od 391 do 447 bp), objašnjava se ponavljanjem sekvence od 8 bp (GAATTACA) koja varira među sojevima, što navode i drugi autori (Schnabel and Jones, 1998; Llop et al., 2000).

Rep-PCR jedna je od prvih molekularnih tehnika koja je korišćena u proučavanju *E. amylovora* (McManus and Jones, 1995b), kako za njenu dijagnostiku, tako i za epidemiološka proučavanja (Versalovic et al., 1991; Louws et al., 1994). Primenom ove metode, McManus and Jones (1995b) lako su detektovali razlike između izolata poreklom iz *Rubus* i izolata iz *Pomoideae*. Korišćenjem rep-PCR u proučavanju izolata sa Severnoameričkog kontinenta, Pulawska and Sobiczewski (2012) izdvojili su 2–3 različita profila, a najveće varijacije dobili su korišćenjem ERIC prajmera. Barionovi et al. (2006) su primenom rep-PCR dokazali da većina sojeva (89 od 93 ispitivanih) *E. amylovora* iz *Maloideae* i *Rosoideae*, iz različitih regiona, ima identične DNK profile, dok je diverzitet potvrđen kod jednog soja iz *Amelanchier* sp. (*Maloideae*) poreklom iz Kanade i tri soja iz *Rubus* sp.

U ovom istraživanju, primenom rep-PCR sa REP, ERIC i BOX prajmerima, izdvojile su se dve grupe sojeva na osnovu dobijenih genetskih profila. Jednu grupu su činili sojevi iz dunje, jabuke i gloga, uključujući i referentni soj (NCPPB 595), a u drugoj grupi su bili sojevi iz kruške. Interesantno je istaći da su svi korišćeni prajmeri izdvojili genetske profile sojeva iz kruške, pa zaključujemo da se ova metoda pokazala pogodnom u diferencijaciji proučavanih sojeva.

Među različitim molekularnim metodama, RAPD-PCR je vrlo korisna i jednostavna metoda za brzu diferencijaciju sojeva, razvijena krajem 1990. godine (Pržulj i Perović, 2005). U odnosu na druge markere, RAPD markeri ne zahtevaju poznavanje genomskih sekvenci. Svaki prajmer omogućava umnožavanje više različitih mesta u genomu, što RAPD markere čini pogodnim za određivanje polimorfizma između jedinki (Tingey et al., 1993) i proučavanje genetskog diverziteta vrste (Baum et al., 1997). Momol et al. (1997) primenili su ovu metodu u proučavanju 16 izolata *E. amylovora* poreklom iz USA, Evrope i Japana. Korišćenjem šest random

prajmera (CUGEA1—CUGEA6), utvrđene su razlike u genomima proučavanih izolata, a na osnovu dobijenih RAPD profila svi izolati klasifikovani su u tri grupe. Za razliku od njih, u RAPD analizi primenom pet random prajmera, Pulawska et al. (2006) potvrdili su visoku homogenost 14 sojeva *E. amylovora*, poreklom iz šest domaćina, iz različitih regiona u Poljskoj.

U ovom radu takođe je primenjena RAPD–PCR u proučavanju genetske varijabilnosti odabranih sojeva *E. amylovora*. Oba korišćena prajmera, CUGEA3 i CUGEA5, pokazala su jaku diskriminativnu moć, izdvajajući sojeve iz kruške u odnosu na sve ostale proučavane sojeve, uključujući i referentni soj. Zaključujemo da se RAPD analiza u ovom istraživanju pokazala kao pogodna za proučavanje heterogenosti populacije *E. amylovora*, jer je kao i rep–PCR, detektovala genetske razlike među proučavanim sojevima.

Molekularne tehnike primenjene u ovom radu, omogućile su brzu identifikaciju bakterije i detekciju razlika u genetskim profilima ispitivanih sojeva *E. amylovora*. U svojim istraživanjima Ivanović i sar. (2010) su primenom molekularnih tehnika (restrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju) utvrdili razlike među ispitivanim sojevima *E. amylovora* (40 sojeva iz Srbije i jedan soj iz Crne Gore). Međutim, te razlike se nisu mogle dovesti u vezu sa domaćinom iz kojeg su sojevi izolovani. U ovom istraživanju, primena molekularnih tehnika (rep–PCR i RAPD PCR) detektovala je razlike između proučavanih sojeva u odnosu na domaćina, izdvajajući sojeve iz kruške od svih ostalih proučavanih sojeva. Uočeni polimorfizam kod sojeva iz kruške verovatno je posledica prilagođavanja domaćinu, tj. promena nastalih u genomu, koje su dovele do formiranja novih mesta za koje se vezao prajmer, što navode i drugi autori (Williams et al., 1990; Jones et al., 1997). Interesantno je zapaziti da su svi sojevi iz kruške imali međusobno identične profile, što govori o njihovoj specijalizaciji prema ovom domaćinu, nezavisno od lokaliteta sa kojeg potiču. Takođe, svi ostali proučavani sojevi poreklom iz različitih rejona i različitih domaćina (dunja, jabuka i glog), kao i referentni izolat *E. amylovora* (NCPBP 595), bili su međusobno identični u profilima.

Iako brojni literaturni podaci ukazuju da je *E. amylovora* homogena vrsta (Billing et al., 1961; Paulin, 2000; Pulawska et al., 2006; Pulawska and Sobiczewski, 2012), pojedine molekularne tehnike omogućile su otkrivanje razlika među sojevima ove bakterije poreklom iz različitih domaćina i geografskih područja (McManus and Jones, 1995a; Kim et al., 1996; Momol and Aldwinckle, 2000; Brennan et al., 2002; Obradović et al., 2007; Ivanović i sar., 2010, 2012). Molekularne tehnike omogućile su mnogo bržu identifikaciju bakterije u odnosu na konvencionalne metode (Bereswill i sar., 1992), kao i proučavanje i diferencijaciju sojeva unutar vrste. Poznavanje genetskog diverziteta *E. amylovora* posebno je važno za epidemiološka proučavanja i utvrđivanje pravaca širenja ove bakterije, njene virulentnosti i otpornosti na pesticide i antibiotike (Paulin, 2000; Jones and Schnabel, 2000; Janse, 2006). U tom smislu, rezultati ovog istraživanja značajan su doprinos u proučavanju populacije fitopatogene bakterije *E. amylovora* na ovom području.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja, možemo izvesti sledeće zaključke:

- Fitopatogena bakterija *Erwinia amylovora* prisutna je i široko rasprostranjena u Crnoj Gori, posebno u severoistočnim i zapadnim delovima zemlje, u kojima se gaje jabučaste voćne vrste;
- Prisustvo bakterije utvrđeno je na pet domaćina, među kojima su četiri voćne vrste (dunja, kruška, jabuka i mušmula) i glog, kao vrsta iz spontane flore;
- Mušmula i glog su dva nova domaćina *E. amylovora* u Crnoj Gori;
- Dunja je najugroženija voćna vrsta i na njoj su simptomi bakteriozne plamenjače najizraženiji, u vidu nekroze cvasti i plamenjače mladara;
- Glog je vrsta iz spontane flore koja na ovom području predstavlja značajan izvor inokuluma za širenje bakterije na jabučasto voće;
- Proučavanjem uticaja meteoroloških faktora na pojavu simptoma bolesti uočena je njihova tesna korelacija i utvrđeno je da se glavna žarišta bakterije nalaze u severoistočnim (Bijelo Polje i Berane) i zapadnim (Nikšić) delovima zemlje;
- Odsustvo simptoma bakteriozne plamenjače u centralnom delu zemlje (Podgorica i Danilovgrad), zbog nepovoljnih uslova za infekciju i širenje bakterije, ima poseban značaj u izboru lokaliteta za podizanje zasada jabučastog voća;
- Test patogenosti je uspešno izveden kod svih ispitivanih izolata, veštačkom inokulacijom zelenih plodova kruške, šljive i jabuke, kao i hipersenzitivnom reakcijom na listu duvana i muškatle;
- U proučavanju morfoloških, odgajivačkih i biohemijско–fizioloških osobina, svi ispitivani izolati pokazali su zajedničke karakteristike, koje poseduje i *E. amylovora*;

- Primenom ELISA i IF testa proučavani izolati pokazali su homogenost i identične antigene osobine kao i *E. amylovora*;
- Ovim istraživanjem su prvi put u Crnoj Gori primenjene molekularne metode u proučavanju *E. amylovora*;
- Primenom Nested PCR, svi ispitivani sojevi produkovali su očekivani specifičan DNK fragment, čime je potvrđena pripadnost vrsti *E. amylovora*;
- Obe primenjene molekularne tehnike, rep-PCR (korišćenjem REP, ERIC i BOX prajmera) i RAPD PCR (korišćenjem CUGEA3 i CUGEA5 prajmera), pokazale su se pogodnim za diferencijaciju sojeva *E. amylovora*, jer su omogućile razdvajanje genetskih profila sojeva iz kruške (bez obzira na lokalitet) u odnosu na sve ostale ispitivane sojeve iz dunje, jabuke i gloja;
- Utvrđene razlike u genetskoj strukturi proučavanih sojeva potvrda su heterogenosti populacije *E. amylovora* na ovom prostoru.

7. LITERATURA

1. Agrios, N. G. (2005): *Plant Pathology* (Fifth Edition). Elsevier Academic Press, Burlington, USA, San Diego, California, USA, London, UK.
2. Arsenijević, M. (1988): Bakterioze biljaka. Drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje. Naučna knjiga Beograd.
3. Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije. IDP „Naučna knjiga”, Beograd.
4. Arsenijević M. (1997): Bakterioze biljaka. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje. S Print, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija.
5. Arsenijević M., Gavrilović M. (2007): Praktični priručnik o bakterioznoj plamenjači jabučastih voćaka i ukrasnih biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu. Beograd, Srbija.
6. Arsenijević, M., Jovanović. G. (1995): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gramu. *Zaštita bilja* 211: 57-62
7. Arsenijević, M., Đurišić, S., Mitrev, S. (1994): Serological identification of *Erwinia amylovora* bacterium a pomaceous tree pathogen. *Zaštita bilja*, Vol 54 (4), br.210, 278-291.
8. Arsenijević, M., Mitrev, S. (1995): Karakteristike nekih atipičnih sojeva bakterija dobijenih prilikom izolovanja *Erwinia amylovora*. *Zaštita bilja* 211: 5-15.
9. Arsenijević M., Panić M., Antonijević D.(1991): Fire blight of pomaceous fruit trees in Yugoslavia. *Zaštita bilja* 43 (196): 87-97.
10. Balaž, J. (1999): Status of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia: Distribution, Identification and Control. Proceedings of the Eight International Workshop on Fire Blight. *Acta Hort.*, No. 489: 99-103.
11. Balaž, J. (2000): *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al. kao parazit jabuke. *Biljni lekar*, br. 6: 457-463.
12. Balaž, J. (2000): Epifitotična pojava bakteriozne plamenjače na jabuci. *Biljni lekar*, 4, 272-275.

13. Balaž J., Grahovac, M., Radunović, D., Iličić, R., Krstić, M. (2013): Status of *Erwinia amylovora* in Former Yugoslav Republics During the Last Two Decades. *Pesticides and Phytomedicine*, 28(1), 9-22.
14. Balaž, J., Smiljanić, A. (2004): *Chaenomeles japonica* and *Cotoneaster horizontalis* new hosts of *Erwinia amylovora* in Serbia. *Zaštita bilja*, Vol. 55 (1-4), No 247-250: 87-96.
15. Balaž J, Knežević T, Smiljanić A., Stojšin V (2004): *Chaenomeles japonica* and *Cotoneaster horizontalis*, new hosts of *Erwinia amylovora* in Serbia. 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy 5-9juli, 2004. Book of abstraks, 22.
16. Balaž, J., Ognjanov, V., Stamenov, V. (1997): *Erwinia amylovora* na jabučastom voću u Vojvodini i mere zaštite. *Biljni lekar*, br. 1: 55-60.
17. Balaž, J., Radunović, D., Krstić, M. (2012): Status of *Erwinia amylovora* in Montenegro. In *Proceedings of International Symposium Current Trends in Plant Protection*. Institute for Plant Protection and Environment Belgrade, Serbia, 2012: 373-378.
18. Barionovi D., Giorgi, S., Stoeger, A.R., Ruppitsch, W., Scortichini, M. (2006): Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1084–1094.
19. Baum, B.R., Nevo, E., Douglas, A., Johnson, A., Beiles, A. (1997): Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 147-157.
20. Bellenot-Kapusta, V., Chartier, R., Brisset, M.N., Paulin, J.P. (2002): Selection of a genotype of *Cotoneaster* with a high level of resistance to fire blight. *Acta Horticulturae*, No.590: 385-392.
21. Beer S.V., Norelli J.L. (1977): Fire blight epidemiology: factors affecting release of *Erwinia amylovora* by cankers. *Phytopathology* 67: 1119-1125.
22. Bennett, R.A., Billing, E. (1978): Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. *Annals of Applied Biology* 89, 41-45.
23. Berrie, A.M., Billing, E. (1996): Hawthorns as a source of fire blight inoculum in English pear and apple orchards. *Acta Horticulturae* 411, 35-40.

24. Bereswill, S., Jock, S., Bellemann, P., Geider, K. (1998): Identifikation od *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. *Plant Disease* 82 (2): 158-164.
25. Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., Geider, K. (1992): Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3522–3526.
26. Billing E., Baker L.A.E., Crosse J.E., Garret C.M.E. (1961): Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *Journal of Applied Bacteriology* 24: 195–211.
27. Bobev, S., Garbeva, P., Hauben, L. (1999): Fire Blight in Bulgaria – Characteristics of *E.amylovora* isolates. *Acta Hort.* No. 489: 121-126.
28. Bonn, W.G., van der Zwet, T. (2000): Distribution and economic importance of fire blight. In: *Fire blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*, Edited by J.L.Vanneste, pp. 37-53, CABI Publishing. Wallingford. UK.
29. Božović, Đ., Jaćimović, V., Lazović, B., Adakalić, M. (2015): Fenološke i pomološke osobine autohtonih sorti jabuke u sjevernoj Crnoj Gori. *Agroznanje*, Vol.16, br.2, 163-171. Univerzitet u Banjaluci, Poljoprivredni fakultet.
30. Braun, P.G., Hildebrand, P.D. (2005): Infection, carbohydrate utilization, and protein profiles of apple, pear, and raspberry isolates of *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(3): 338-346.
31. Brennan, J.M., Doohan, F.M., Egan, D., Scanlan, H., Hayes, D. (2002): Characterization and Differentiation of Irish *Erwinia amylovora* Isolates. *Journal of Phytopathology* 150: 414–422.
32. Calzolari, A., Mazzucchi, U., Gasperini, C. (1982): Cross-reactions between *Erwinia amylovora* and other bacteria in immunofluorescence staining using different antisera. *Phytopathologia Mediterranea*, 21 (2/3):110-112.
33. Cvjetković, B., Halupecki, E., Špoljarić, J. (1999): The occurrence and control of fire blight in Croatia. *Acta Horticulturae* 489: 71-76.
34. Dreo T., Župančič M., Demšar T., Ravnikar M. (2006): First Outbreaks of Fire Blight in Slovenia. *Acta Horticulturae* No.704: 37-41.
35. EPPO-Reporting Service (1991): *Erwinia amylovora* present in Yugoslavia. 509/14.

36. Forsline, P.L., Aldwinckle, H.S. (2002): Natural occurrence of fire blight in USDA apple germplasm collection after 10 years of observation. *Acta Horticulturae*, No.590: 351-357.
37. Gavrilović, V. (1998): Bakteriološke odlike sojeva *Erwinia amylovora* (Buriill) Winslow et al. različitog porekla. *Zaštita bilja*, Vol. 49 (2), 224: 121-167.
38. Gavrilović, V. (2006): Patogene i biohemijsko fiziološke odlike bakterija roda *Pseudomonas* patogena voćaka. *Zaštita bilja*, Vol 57 (1-4), 5-55.
39. Gavrilović, V. (2009): *Erwinia amylovora* – parazit jabučastih voćaka u Srbiji, Zbornik radova, Inovacije u voćarstvu, II savetovanje, Beograd, 11-12. februar, str. 107-117.
40. Gavrilović, V. (2010) Ukrasne i spontano rastuće biljke domaćini *Erwinia amylovora* u Srbiji. *Zaštita bilja*, Vol. 61 (3), 169-180.
41. Gavrilović, V., Arsenijević, M. (1998): Vatretni trn – novi domaćin bakterije *Erwinia amylovora* za našu zemlju. *Biljni lekar* 1: 52-55.
42. Gavrilović, V., Arsenijević, M., Panić, M., Jovanović, G. (2001): Spread of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia and control measures. *Plant Protection*, 237: 141-158.
43. Gavrilović, V., Milijašević, S., Todorović, B., Živković, S., Trkulja, N. (2008): *Erwinia amylovora* – prouzrokovatelj nekroze korenovog vrata stabla jabuke. *Pesticidi i fitomedicina* 23: 17-23.
44. Gavrilović, V., Obradović, A., Milijašević, S., Arsenijević, M., Vojinović, M. (2007): *Sorbus* sp. – a new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. 11th International Workshop on Fire Blight, 12-17 August, Portland, Oregon, USA. *Book of Abstracts*, 69.
45. Gorris, M.T., Cambra, M., Lecomte, P., Llop, P., Chartier, R., Paulin, J.P., Lopez, M.M. (1996): A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae* 411: 41-46.
46. Ivanović, M., Minsavage, G., Jones, J., Gašić, K., Gavrilović, V., Balaž, J., Obradović, A. (2010): Grouping of *Erwinia amylovora* strains from Serbia and Montenegro based on PFGE. In: *Book of abstracts 12th international workshop on fire blight*, p 28. Warsaw, Poland.
47. Ivanović, M., Obradović, A., Gašić, K., Minsavage, G.V., Dickstein, E.R., Jones, J.B. (2012): Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *European Journal of Plant Pathology* 133: 545–557.

48. Janse J.D. (2006): *Phytopathology – Principles and practice*. USA: CABI Publishing.
49. Jock, S., Donat, V., Lopez M.M., Bazzi, C., Geider, K. (2002): Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology* 4 (2): 106-114.
50. Jones and Geider (2001): Gram-negative bacteria, *Erwinia amylovora* Group. In: *Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Eds. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W.APS Press, St.Paul, USA, pp. 40-55.
51. Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. (1997): Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137: 165-177.
52. Jones, A.L., Schnabel, E.L. (2000): The development of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora*. In *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, J. L. Vanneste (Ed.). pp. 235–251. Wallingford: UK. CABI Publishing.
53. Jovanović, G. (1999): Rasprostranjenost, značaj i domaćini bakterije *Erwinia amylovora* na teritoriji južne Srbije. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
54. Keck, M., Hevesi, M., Ruppitsch, W., Stroger, A., Richrer, S. (2002): Spread of fire blight in Austria and Hungary – variability of *Erwinia amylovora* strains. *Plant Protection Science* 38 (1) 49-55.
55. Kim, J.H., Beer, S.V., Tanii, A., Zumoff, C.H., Laby, R.J., Gustafson, H.L., Aldwinckle, H.S. (1996): Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. *Acta Horticulturae* 411: 183–186.
56. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (1990): *Methods in phytopathology*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.
57. Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A., Perombelon, C.M.C., Moore, L.W. (1990): Inoculation of plant tissues. In Z. Klement, K. Rudolph, D.C. Sands (Eds.), *Methods in phytopathology*, pp. 95–124. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.
58. Korba, J., Sillerova, J., Kudela, V. (2008): Resistance of apple varieties and selections to *Erwinia amylovora* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 44, 91–96.
59. Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987): *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*, British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
60. Lin, C., Chen, T., Wells, J., Van der Zwet, T. (1987): Identification and detection of *Erwinia amylovora* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 77: 376-380.

61. Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., López, M.M. (2000): Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology 66: 2071–2078.
62. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Penalver, J., Cambra, M. (2002): Standardization of diagnostic protocols (Diagpro) for *Erwinia amylovora* in the Eouropean Union. Acta Horticulturae, No.590: 69-72.
63. Louws, F.J., Rademaker, J.L.W., Bruijn, F.J. (1999): The three Ds of PCR- based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. Annual Review Phytopathology 37: 81-125.
64. Luby, J.J., Alspach, P.A., Bus VGM, Oraguzie, N.C. (2002): Field resistance to fire blight in a diverse apple (*Malus* sp.) germplasm collection. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127 (2): 245-253.
65. Manulis, S., Kleitman, F., Dror, O., David, I., Zutra, D. (1998): Characterization of the *amylovora* population in Israel. Phytoparasitica, 26 (1): 39-46.
66. McLaughlin, R.J., Chen, T.A., & Wells, J.M. (1989): Monoclonal antibodies against *Erwinia amylovora*: Characterization and evaluation of a mixture for detection by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology, 79 (5).
67. McManus, P.S., Jones, A.L. (1995a): Detection of *Erwinia amylovora* by Nested PCR and PCR-Dot-Blot and Reverse-Blot Hybridizations. Phytopathology 85: 618-623.
68. McManus, P.S., Jones, A.L. (1995b): Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. Phytopathology 85: 1547–1553.
69. Miller, T.D., Schroth, M.N. (1972): Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopathology, 62 (10): 1175-1182.
70. Mijušković, M. (2002): Prilozi proučavanju biljnih bolesti u Crnoj Gori, Crnogorska akademija nauka i umjetnosti, Podgorica, 2002.
71. Minardi, T.F., Stefani, P., Mazzucchi, U. (2000): *Erwinia amylovora* isolates associated with 1997 fire blight epidemic in the Po Valey derived from the same clone. In: Book of abstracts 9th congress of the European foundation for plant pathology, „biodiversity in plant pathology“, Taromina, p 37.

72. Momol, T.M., Aldwinckle, H. S. (2000): Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In Fire blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. J.L.Vanneste (Ed.). Wallingford: CABI Publishing. pp. 55–72.
73. Momol, M.T., Momol, E.A., Lamboy, W.F., Norelli, J.L., Beer, S.V., Aldwinckle, H.S. (1997): Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *Applied Microbiology* 82: 389–398.
74. Nemeth, J. (1998): Occurrence and spread of Fire Blight (*Erwinia amylovora*) in Hungary (1996-1998). Management of the Disease. *Acta Hort.* No.489: 177-183.
75. Nicholson, R.L., Beckerman, J. (2008): Towards a Sustainable, Integrated Management of Apple Diseases. In: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria (Ed. Ciancio, A., Mukerji, K.G.) Springer Science+Business Media B.V.
76. Norelli, J.L., Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. (2003): Fire blight management in the twenty-first century using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 87(7), 756–765.
77. Obradović, D., Balaž, J., Kevrešan, S. (2007): Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Microbiology* 76: 748–756.
78. Obradović, D., Kevrešan, S. (2010): Optimization of PCR in Application of Hot Start *Taq* DNA Polymerase for Detection of *Erwinia amylovora* with Primers FER1-F and FER1-R'. *Microbiology*, Vol. 79, No 6, pp. 816-821.
79. Obradović, A., Vučinić, Z., Gavrilović, V. (2003): Epifitotična pojava bakteriozne plamenjače dunje u Srbiji i Crnoj Gori. In VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija. Zbornik rezimea. 84-84.
80. OEPP/EPPO (2013): Diagnosis of *Erwinia amylovora*. Protocol for the diagnosis of quarantine organism. SMT Project SMT-4-CT98-2252, Bulletin 43, 21–45, 2013.
81. Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka – *Erwinia amylovora*. Zajednica za voće i povrće Beograd D.D., Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
82. Paulin, J.P. (2000): *Erwinia amylovora*: General Characteristics, Biochemistry and Serology. In: Fire blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, Vanneste JL (ed.). CABI Publishing, Wallingford. pp 87–116.

83. Paulin, J.P., Samson, R. (1973): Le feu bacterien en France. II. Caracteres des souches d *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., 1920, isolees du Foyer Franco-Belge. Annales de Phytopathologie 5: 389-397.
84. Persen, U., Gottsberg, R., Reisenzein, H. (2011): Spread of *Erwinia amylovora* in apple and pear trees of different cultivars after artificial inoculation. ISHS Acta Horticulturae, 896: 319-331.
85. Pržulj, N., Perović, D. (2005): Molekularni markeri. Slučajno umnožena polimorfna DNK. „Selekcija i semenarstvo“, Plant Breeding and Seed Production, Vol. XI, No.1-4, 81-91. Novi Sad.
86. Psallidas, P.G., Tsiantos, J. (2000) : Chemical Control of Fire Blight. In *FireBlight. The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. J.L. Vanneste (Ed.), pp. 199-234, Hamilton, New Zealand: CABI Publishing.
87. Puławska, J., Kielak, K., Sobiczewski, P. (2006): Phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains. Acta Horticulturae 704: 439–444.
88. Puławska, J., Sobiczewski, P. (2012): Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. Tress 26: 3-12.
89. Radunović, D., Gavrilović, V. (2013): Monitoring *Erwinia amylovora* u Crnoj Gori. In: Zbornik rezimea radova, 172-173. XII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija.
90. Radunović, D., Gavrilović, V., Gašić, K., Krstić, M. (2015a): Monitoring of *Erwinia amylovora* in Montenegro. Pesticides and Phytomedicine 30(3): 179-185.
91. Radunović, D., Gavrilović, V., Gašić, K., Paunović, M., Stojšin, V., Grahovac, M. (2017): Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains originated from pome fruits and indigenous plant in Montenegro. Journal of Plant Pathology, 99 (1), 197-203.
92. Radunović, D., Gavrilović, V., Krstić, M. (2013): Bacterial characteristics of *Erwinia amylovora* strains originating from pome fruits and ornamental plants in Montenegro. Plant Protection 64(1): 7-13.
93. Radunović D., Gavrilović V., Krstić M. (2015b): Influence of Meteorological Factors on the Occurrence of Fire Blight Symptoms in Different Regions of Montenegro. In: D. Marčić, M. Glavendekic, P. Nicot (eds). *Proceedings of the 7th Congress on Plant Protection. Belgrade* 2015: 135-137.

94. Rico, A., Fuhrer, M.E., Ortiz-Barredo, A., Murillo, J. (2008): Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology* 98: 260-269.
95. Sands, D.C. (1990): Physiological criteria – determinative tests. In: *Methods in Phytobacteriology*. Eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 133-143.
96. Saygili, H., Aysan, Y., Mirik, M., Sahin, F. (2006): Severe Outbreak of Fire Blight on Quince in Turkey. *Acta Hort.*, No.704: 51-54.
97. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (2001): *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd. Ed. APS Press. St. Paul, USA.
98. Schnabel, E.L., Jones, A.L. (1998): Instability of a pEA29 Marker in *Erwinia amylovora* Previously Used for Strain Classification. *Plant Disease* 82: 1334-1336.
99. Smith, I.M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips, D.H., Archer, S.A. (1988): *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
100. Sobiczewski, P., Deckers, T., Pulawska, J. (1997): *Fire Blight (Erwinia amylovora). Some aspects of epidemiology and control*. Phare, Brussels, Belgium.
101. Statistički godišnjak Crne Gore za 2012. godinu (2013). MONSTAT – Zavod za statistiku Crne Gore. Podgorica.
102. Statistički godišnjak Crne Gore za 2013. godinu (2014). MONSTAT – Zavod za statistiku Crne Gore. Podgorica.
103. Statistički godišnjak Crne Gore za 2014. godinu (2015). MONSTAT – Zavod za statistiku Crne Gore. Podgorica.
104. Strategija razvoja poljoprivrede i ruralnih područja 2015-2020., Jun, 2015., Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja, Podgorica, Crna Gora.
105. Steiner, P.W. (2000a): *The Biology and Epidemiology of Fire Blight*. West Virginia University, Morgantown, WV, USA.
106. Steiner, P.W. (2000b): *Integrated Orchard and Nursery Management for the Control of Fire Blight*. *Fire blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*, Vanneste J.L. (ed.), pp. 339-359, Wallingford: CABI Publishing.

107. Suslow, T.V., Schroth, M.N., Isaka, M. (1982): Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. *Phytopathology*, 72: 917-918.
108. Taylor, R.K., Hale, C.N. (1998): Identification and characterisation of isolates of *Erwinia amylovora* from cotoneaster in Austria. *Aust Biotechnol* 6: 353-356.
109. Tingey, S.V., Rafalski, J.A., Williams, J.G.K. (1993): Genetic analysis with RAPD markers. In: Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Neff, M (ed.). pp. 3-8. ASHS Publishers, Minnesota, USA.
110. Thomson, S.V. (2000): Epidemiology of Fire Blight. In: Fire blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, Vanneste J.L. (ed.), pp. 9-37, Wallingford: CABI Publishing.
111. Thomson, S.V., Schroth, M.N., Moller, W.J., Reil, W.O. (1975): Occurrence of fire blight of pears in relation to weather and epiphytic populations of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 65, 353-358.
112. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2004): Microbiology: an introduction. Pearson education, INC, San Francisco, California.
113. Turechek, W. W. (2004): Apple Diseases and their Management. In: Diseases of Fruits and Vegetables, Edited by S.A.M.H.Naqvi, Kluwer Academic Publishers.
114. Vanneste, J.I., Eden-Green, S. (2000): Migration of *Erwinia amylovora* in Host Plant Tissues. In: Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Edited by J.L.Vanneste, pp. 73-83, CABI Publishing. Wallingford. UK.
115. Vanneste, J.I., Paulin, J.P. (1990): Isolation of lytic phages of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 273, 95-98.
116. Van der Zweet, T., Beer, S.V. (1999): Fire Blight: Its Nature, Prevention and Control. A Practical Guide to Integrated Diseases Menagement. Department of Agriculture. Agricultural Bulletin No.631. pp 83.
117. Van der Zwet, T., Keil, H.L. (1979): Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous plants. U.S. Department of Agriculture, *Agriculturae Handbook* 510, Washington, D.C. pp 200.
118. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823–6831.

119. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F., Lupski J.R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.
120. Vojinović, M. (2005): Domaćini i rasprostranjenost *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. u nišavskom okrugu. *Zaštita bilja*, Vol. 56 (1-4), 25-54.
121. Vojinović, M., Gavrilović, V. (2009): Karakteristike sojeva *Erwinia amylovora* poreklom s gloga na području Sjenice. *Zaštita bilja*, Vol.60 (3), 177-186.
122. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531- 6535.
123. Zhang, Y., Geider, K. (1997): Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by Pulsed-Field gel Electrophoresis *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4421-4426.

www.nysaes.comell.edu

8. PRILOG

Pregled fotografija:

1. Identikit PTA ADGEN Phytodiagnostics za detekciju *E. amylovora*
2. Automatski čitač seroloških ploča Universal Microplate Reader ELx800
3. Pločice sa antigenim poljima za IF test
4. Fluorescentni mikroskop Olympus BX51
5. Bakteriozna plamenjača mladara na mladom stablu dunje
6. Povijanje zaraženog mladara dunje u vidu „pastirskog štapa”
7. Nekroza cveta dunje
8. Nekroza lišća i mladih plodova jabuke
9. „Pastirski štap” – savijanje vrha mladara jabuke
10. i 11. Crna nekroza lišća na mladom stablu kruške
12. Zaraženo stablo dunje
13. Nekroza lišća i cvasti dunje
14. i 15. Simptomi bakteriозne plamenjače na lišću i plodu mušmule
16. i 17. Simptomi bakteriозne plamenjače na grančicama gloga
18. Bakteriozna plamenjača na starom stablu divlje kruške
19. i 20. Plamenjača mladara u krošnji dunje
21. i 22. Plamenjača mladara na stablu jabuke
23. i 24. Simptomi bakteriозne plamenjače na glogu
25. i 26. Crna nekroza plodića i lišća kruške
27. Osušena grana na stablu kruške
28. Pucanje kore na deblu kruške
29. i 30. Lučno povijen zaražen mladar na mladom stablu dunje
31. i 32. Simptomi bakteriозne plamenjače na grani, lišću i plodićima kruške
33. Zaraženo mlado stablo dunje
34. Tamna nekroza mladara
35. Nekroza lišća i cvetova
36. Početni simptomi u vidu sušenja cveta i listova
37. Crna nekroza duž lisnih nerava i na vrhu plodića
38. Nekrotiran cvet i cvetna drška sa prisustvom bakterijske sluzi
39. Jaka zaraza mladog stabla kruške
40. Osušeni mladari sa lišćem
41. Lučno savijen nekrotiran mladar

42. Smežuran plodić crne boje
43. Tamna nekroza na starijem plodu
44. Ispucala kora grane
45. Mrko –crvena obojenost tkiva sa jasno uočljivim prelazom između zdravog i obolelog dela grane
46. Plamenjača mladara sa karakterističnim lučno savijenim vrhom
47. Osušena starija grana
48. Mrka nekroza na plodu i lišću
49. Nekroza grane i pupoljka sa karakterističnom mrko–crvenom bojom
50. Jaka infekcija cvetova i tek formiranih plodića
51. Nekroza mladog ploda
52. Mrka nekroza lišća
53. Zaraženo lišće i plodići
54. Crna nekroza ploda
55. Nekroza plodića
56. Lučno savijen vrh zaražene grančice
57. Tamna nekroza cvasti i lišća
58. a) Meteorološka stanica (Metos)
b) Grafički i tabelarni prikaz podataka o meteorološkim faktorima
59. Tamnozeleni vlažni pegi na mestu uboda, drugog dana od inokulacije
60. Pojava kapljica bakterijskog eksudata, trećeg dana od inokulacije
61. Nekroza na mestima uboda, četvrtog dana nakon inokulacije
62. Širenje nekroze i bakterijski eksudat, pet dana nakon inokulacije
63. Potpuna nekroza ploda, sedam dana nakon inokulacije
64. Levo negativna kontrola, desno crna nekroza sa bakterijskim eksudatom kod izolata *E. amylovora*
65. Jasno uočljivi kapi bakterijskog eksudata na smežuranom pocrnalom plodu
66. Levo–vlažni pegi na mestima uboda, dan nakon inokulacije, desno–negativna kontrola
67. Pojava ulegnutih tamnih pega na mestima uboda, drugog dana od inokulacije
68. Nekroza sa mnoštvom kapljica bakterijskog eksudata, trećeg dana nakon inokulacije
69. Mrka nekroza i kapljice bakterijskog eksudata na zelenom plodu jabuke, 4 dana nakon inokulacije
70. Hipersenzitivna reakcija na listu duvana
71. Formiranje končića kod *E. amylovora*
72. „Levan” tip kolonija *E. amylovora* na NSA podlozi
- 73 i 74. „Levan” tip kolonija na NSA podlozi
- 75 i 76. Izgled kolonija na King B podlozi
77. Levo –pojava fluorescencije kod *P. syringae*, desno – odsustvo fluorescencije kod izolata *E. amylovora*
78. Kolonije sa „kraterastim” udubljenjima na CG podlozi
79. Negativna oksidaza – levo izolat *E. amylovora*, desno pozitivna kontrola

80. Pojava mehurića kao znak aktivnosti katalaze
81. Redukcija nitrata – levo mrka boja kod pozitivne kontrole, desno izolat *E. amylovora*
82. Osetljivost na streptomycin – pojava zone inhibicije
83. OF test (anaerobni uslovi) – levo negativna kontrola, desno pojava žute boje u podlozi kod izolata *E. amylovora*
84. OF test (aerobni uslovi) – levo pojava žute boje u podlozi kod izolata *E. amylovora*, desno negativna kontrola
85. Žuta boja u bunarčićima kao znak pozitivne reakcije u ELISA testu
- 86 i 87. Fluorescentne ćelije proučavanih sojeva *E. amylovora* uočene pod fluorescentnim mikroskopom u IF testu (slika levo– izolat EaM3 iz dunje, slika desno– *E. amylovora* NCPPB 595)
88. Produkti amplifikacije DNK proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni u Nested PCR
89. Genetički profili proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem REP prajmera
90. Amplifikacioni fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem ERIC prajmera
91. Amplifikacioni fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem BOX prajmera
92. RAPD fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijenih korišćenjem CUGEA3 prajmera
93. RAPD fragmenti proučavanih sojeva *E. amylovora* dobijeni korišćenjem CUGEA5 prajmera

Pregled tabela:

1. Struktura poljoprivrednih površina po rejonima
2. Poljoprivredno zemljište po kategorijama korišćenja za period 2012–2014. godine
3. Proizvodnja voća u Crnoj Gori u 2014. godini
4. Proizvodnja voća na plantažama u 2014. godini
5. Ocena procentualne zahvaćenosti stabla bakterioznom plamenjačom
6. Proučavani izolati *E. amylovora* poreklom iz Crne Gore
7. Kontrolni sojevi bakterija korišćeni u istraživanju
8. Sojevi *E. amylovora* korišćeni u ELISA i IF testu
9. Sojevi *E. amylovora* korišćeni u molekularnim analizama
10. Nested PCR – prajmeri korišćeni za detekciju sojeva *E. amylovora*
11. Rep i RAPD PCR – prajmeri korišćeni za diferencijaciju sojeva *E. amylovora*
12. Ocena intenziteta zaraze dunje, kruške i jabuke, u 2012. godini
13. Ocena intenziteta zaraze dunje, kruške i jabuke, u 2013. godini
14. Ocena intenziteta zaraze dunje, kruške i jabuke, u 2014. godini
15. Raspored ispitivanih sojeva u pločici i vrednosti apsorpcije u ELISA testu

Pregled grafikona:

1. Karta teritorijalnog rasporeda poljoprivrednih rejona u Crnoj Gori
2. Mapa Crne Gore sa lokacijama meteostanica
3. Prisustvo i rasprostranjenost *E. amylovora* u Crnoj Gori (2012–2015. g.)

Pregled grafika:

1. Struktura korišćenog poljoprivrednog zemljišta u Crnoj Gori u 2013. godini
2. Ciklus razvoja *Erwinia amylovora*

BIOGRAFIJA

Dragana Z. Radunović, master inženjer poljoprivrede

Rođena je 03.10.1965. godine u Kikindi. Osnovnu i srednju školu završila je u Zrenjaninu. Na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, diplomirala je 1991. godine na Odseku za zaštitu bilja, sa prosečnom ocenom 9, odbranivši diplomski rad na temu „Suzbijanje korova u šećernoj repi primenom herbicida“, sa ocenom 10. Diplomске akademske - master studije završila je 2011. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, na studijskom programu Fitomedicina, sa prosečnom ocenom 9,86, a master rad na temu „Pojava *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na kupusnjačama u Crnoj Gori“, odbranila sa ocenom 10. Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu upisala je školske 2011/2012. godine, na odseku Agronomija.

Iskustvo u struci sticala je od 1995. godine u Z.D.D. „Agrovet“, Melenci i u D.O.O. „Žitohem“, Zrenjanin, na poslovima zaštite bilja. Od 2005. godine radi na Biotehničkom fakultetu u Podgorici, u Savjetodavnoj službi za biljnu proizvodnju – stručnoj službi Ministarstva poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore, na poslovima stručne saradnice za zaštitu bilja. Tokom rada organizovala je i održala veliki broj stručnih predavanja za poljoprivredne proizvođače i snimila i objavila brojne stručne priloge i tekstove na različite teme iz oblasti zaštite bilja. Učestvovala je u radu Komisija Ministarstva poljoprivrede i ruralnog razvoja: Komisija za realizaciju Agrobudžetskih linija za dodelu kredita poljoprivrednim proizvođačima, Komisija za podršku investicijama u poljoprivredi kroz MIDAS program Svetske banke i dr.

U periodu od 2008. do 2012. godine, bila je koordinatorka projekta „Agroproгноza“, koji se realizovao u saradnji sa Agencijom SAD za međunarodni razvoj USAID/IRD, a obuhvatao je prognozu pojave štetnih organizama na najvažnijim poljoprivrednim kulturama u Crnoj Gori.

Učestvovala je u realizaciji Projekata Fitosanitarne uprave Crne Gore iz oblasti zdravstvene zaštite bilja i Programa fitosanitarnih mera za 2010. i 2011. godinu (posebnog nadzora nad karantinskim štetnim organizmima – oblast bakteriologija), koji su finansirani od strane Ministarstva poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore.

Kao saradnica u istraživanju, u periodu od 2012. do 2015. godine, učestvovala je u realizaciji Nacionalnog Naučnoistraživačkog projekta „Serološka i molekularna karakterizacija sojeva *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. dobijenih sa različitih biljnih vrsta u Crnoj Gori“, čiji je nosilac bio Biotehnički fakultet u Podgorici, a koji su finansirali Ministarstvo nauke i Ministarstvo poljoprivrede Crne Gore.

U periodu od 2011. do 2015. godine, bila je angažovana kao stručna saradnica za izradu baznih studija iz oblasti poljoprivrede, za potrebe Prostorno urbanističkih planova Opština Šavnik i Kolašin, kao i Prostornih planova posebne namene Nacionalnog parka Durmitor i Nacionalnog parka Skadarsko jezero.

Autorka je više naučnih i stručnih radova objavljenih u nacionalnim i međunarodnim časopisima. Objavila je nekoliko brošura namenjenih poljoprivrednim proizvođačima (Zaštita vinove loze, Zaštita povrća i Priručnik za primenu pesticida). Učesnica je brojnih regionalnih i nacionalnih naučnih skupova iz oblasti poljoprivrede. Članica je Društva za zaštitu bilja Srbije. Služi se engleskim i ruskim jezikom.